

Desenvolvimento de substitutos ósseos à base de cerâmicos porosos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor João Paulo Borges
Orientador: Professor Doutor Jorge Carvalho Silva

Departamento de Física
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

Junho 2012

Desenvolvimento de substitutos ósseos à base de cerâmicos porosos

Copyright ©2012 – Todos os direitos reservados. Ana Rita Rodrigues de Carvalho.
Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais, Teresa e Alcino por tudo...

Agradecimentos

Nesta parte queria deixar umas palavras de apreço por todos aqueles que tornaram possível que chegasse ao final deste trabalho, de forma directa ou indirecta, mas contribuindo sempre de modo positivo.

Aos meus orientadores o Professor Doutor João Paulo Borges do Departamento de Engenharia de Materiais e o Professor Doutor Jorge Carvalho Silva do Departamento de Física, sem eles não tinha sido possível fazer este trabalho, um muito obrigada por me terem aceite para trabalhar convosco, pelo que me ensinaram no último ano, pela dedicação, incentivo e apoio.

Um especial agradecimento à Ana Baptista, o meu grande patamar no início do laboratório, obrigada pela amizade, disponibilidade, conhecimento, incentivo.

Muito obrigada às minhas duas grandes companheiras de laboratório a Rita e Susana, por me aturarem, por me ajudarem, por me incentivarem, foi um prazer trabalhar convosco, além de colegas ganhei duas amigas.

Obrigada ao Grupo de Polímeros, pela disponibilidade sempre que precisei.

Um muito obrigada à Doutora Joana Vaz Pinto, CENIMAT, pela disponibilidade em ajudar no difractómetro, pela dedicação em procurar aprender mais para poder analisar devidamente os resultados.

Ao Professor Rui Silva do grupo CENIMAT, por disponibilizar e preparar o SEM para obtenção das imagens.

Ao Professor Nuno Leal, departamento das Ciências da Terra, pela disponibilidade na recta final em dourar as amostras tão brevemente.

Aos meus colegas e amigos da faculdade Joaquim, Sara, Aninhas, Nuno, Rita de Moraes Rosa e Hugo, que me aturaram os meus devaneios e eu os deles, muito obrigada.

Apesar de não estar tão presente na execução deste trabalho, muito obrigada à Ana, a grande amiga que levo desta faculdade para a vida.

À minha tia Dete, por tudo.

Aos meus amigos, essenciais na minha vida à Daniela, à Dóris, à Inês, à Liliana, à Sofia, ao Jorge e ao Tiago. Um especial agradecimento com muitas saudades à Filipa, a pessoa mais persistente e

casmurra que conheci até hoje, “ luta por aquilo que queres sempre...”

Ao Diogo muito obrigada pela amizade, amor e apoio ao longo destes anos, apesar de em grande parte deste trabalho estar a milhares de quilómetros de distância e não estar presente, sempre me motivou e ajudou a ultrapassar esta etapa com enorme paciência.

E por último, às quatro pessoas mais importantes da minha vida, a minha mãe e o meu pai, que são os melhores pais do Mundo, os meus pilares, um enorme obrigada por tudo e por todo o amor que me deram, ao meu irmão João que sempre que possível ajudou-me com o seu conhecimento, a sua amizade e a sua tontice e à minha irmã Joana, que com a sua diferença me tornou uma pessoa melhor e me mostrou que um sorriso e um olhar podem valer mais que qualquer palavra.

Resumo

Os fosfatos de cálcio são os constituintes inorgânicos principais dos tecidos duros e apresentam como principais vantagens o facto de serem bioactivos, biocompatíveis e osteoconductores. Os fosfatos mais conhecidos são a hidroxiapatite e o fosfato tricálcico. A hidroxiapatite aparece na forma carbonatada nos ossos e dentes.

Este trabalho teve como objectivo produzir matrizes porosas à base de hidroxiapatite e fosfato tricálcico. Os fosfatos de cálcio usados neste trabalho foram produzidos pela técnica de sol-gel e foram caracterizados recorrendo à difracção de raios-X. Neste contexto, verificou-se que a fase beta do fosfato tricálcico só aparece a partir dos 800°C e que a amostra mais pura de hidroxiapatite é sinterizada a 700°C, após 48 horas de envelhecimento, apresentando uma cristalinidade elevada. As matrizes porosas foram obtidas por adição de NaCl (70%,80% (v/v)) aos pós de fosfatos de cálcio sintetizados.

Após a lixiviação do sal e tratamento térmico de sinterização foram obtidas estruturas porosas tridimensionais. A avaliação da porosidade e interconexão dos poros foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento.

Palavras chave: Hidroxiapatite, β -fosfato tricálcico, método sol-gel, lixiviação, espumas.

Abstract

Calcium phosphates are the hard tissues main inorganic constituents and present such key advantages as the fact that they are bioactive, biocompatible and osteoconductive.

The best-known phosphates are hydroxyapatite and tricalcium phosphate.

The carbonated hydroxyapatite is found in bones and teeth.

This work aimed to produce porous matrices based on hidroxiapatite and tricalcium phosphate.

The calcium phosphates used in this study were produced by sol-gel technique and were characterized using X-ray diffraction. In this context, it was found that the tricalcium phosphate beta phase appears only at 800°C and hydroxyapatite sintered at 700°C, after 48 hours of aging showed the highest crystallinity. The porous matrices were obtained by adding NaCl (70%, 80% (v / v)) to the calcium phosphate synthesized powders.

The salt leaching and heat treatment sintering processes yielded three-dimensional porous structures. Scanning electron microscopy assessed the evaluation of the porosity and pore interconnections.

Keywords: Hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, sol-gel, salt leaching, foams.

Índice de Matérias

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice de Matérias	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xvii
Lista de acrónimos	xix
1. Introdução	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Biomateriais	3
1.3 Biocerâmicos	4
1.4 Fosfatos de Cálcio	5
1.4.1 Hidroxiapatite	6
1.4.2 β -Fosfato tricálcico	7
1.4.3 Os Fosfatos de Cálcio e a Engenharia de Tecidos	8
1.5 Osso/implante	9
1.6 Método Sol-Gel	10
1.6.1 Fases do Sol-Gel	10
Formação do Sol	10
Formação do Gel	10
Envelhecimento	11
Secagem	11
Sinterização	11
1.7 Espumas	12
2. Materiais e Métodos	15
2.1 Síntese da hidroxiapatite pelo método Sol-Gel	15
2.1.1 Materiais	16
2.1.2 Procedimento experimental	16
2.2 Síntese do β -fosfato tricálcico pelo método Sol-Gel	17
2.2.1 Materiais	18
2.2.2 Procedimento experimental	18

2.3 Produção de grãos de sal esférico	19
2.4 Caracterização dos pós	20
2.4.1 Difraccção de Raios-X	20
2.4.2 Espectroscopia de Infravermelho	22
2.4.3 Microscopia electrónica de transmissão	24
2.5 Preparação das espumas porosas	26
2.6 Caracterização das espumas	29
2.6.1 Microscopia electrónica de varrimento	29
2.6.2 Calorimetria diferencial de varrimento	30
3. Apresentação e discussão de resultados	33
3.1 Caracterização dos pós	33
3.1.1 HA	33
3.1.1.1 Difraccção de Raios X	33
3.1.1.2 FTIR	39
3.1.1.3 TEM	40
3.1.2 β -TCP	41
3.1.2.1 Difraccção de Raios X	41
3.1.2.2 FTIR	43
3.1.2.3 TEM	44
3.2 Caracterização do sal	45
3.3 Caracterização das espumas	47
Método A	47
Método B	49
4. Conclusões e Perspectivas Futuras	53
5. Bibliografia	55
ANEXOS	A.1
ANEXO I	A.1
ANEXO II	A.2

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Imagem microcópica, um <i>scaffold</i> de fosfato de cálcio macroporoso, implantado no músculo de cabra, ao fim de 12 semanas, mostra a formação do osso a roxo escuro (Bronzino, 2008)	5
Figura 1.2 – Estrutura tridimensional da Hidroxiapatite (Park, 2008).	7
Figura 1.3 – Representação esquemática do Processo Sol-Gel (Rath, 2005)	13
Figura 2.1 – Esquema da síntese da HA.	15
Figura 2.2 – Formação do gel.	17
Figura 2.3 – Esquema da síntese do β -TCP	17
Figura 2.4 – Fotografia da montagem experimental	19
Figura 2.5 – Fotografia da lavagem do β -TCP.	19
Figura 2.6 – Montagem para a preparação de grão de sal esférico	20
Figura 2.7 – Reflexão de raios X por duas camadas de átomos. A onda de baixo percorre uma distância que excede em $2d \cdot \sin \theta$ a distância percorrida pela onda de cima. Para que as duas ondas voltem a estar em fase, após a reflexão, a igualdade $n\lambda = 2d \cdot \sin \theta$ deve ser verdadeira (Chang, 2005).	21
Figura 2.8 – Difractómetro <i>PANalytical XPert PR</i>	22
Figura 2.9 – Espectrómetro <i>FT-IR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation</i>	24
Figura 2.10 – Diagrama esquemático do microscópio electrónico de transmissão .	25
Figura 2.11 – <i>Hitachi H-8100 Electron Microscope</i>	26
Figura 2.12 – Esquema do Método B.	29
Figura 2.13 – Diagrama esquemático do microscópio electrónico de varrimento (Egerton, 2005).	30
Figura 2.14 – Fotografia do aparelho de DSC.	31
Figura 3.1 – Difractogramas da <i>HA</i> com uma temperatura de sinterização de 800 °C	34
Figura 3.2 – Difractogramas da <i>HA</i> com uma temperatura de sinterização de 600 °C	35
Figura 3.3 – Difractogramas da <i>HA</i> com uma temperatura de sinterização de 700 °C	36
Figura 3.4 – Difractogramas para <i>HA</i> sinterizada a 600 °C e 700 °C com um envelhecimento de 48 horas	37
Figura 3.5 – Espectro de FTIR da <i>HA</i> sinterizada a 700 °C, com envelhecimento de 48 horas.	39
Figura 3.6 – Imagens de TEM dos pós de HA sinterizados a 700°C, com um envelhecimento de 48 horas. A) Pós isolados B) Pós aglomerados.	40
Figura 3.7 – Difractogramas para o β - <i>TCP</i> sinterizado a 600 °C, 700 °C e 800 °	42
Figura 3.8 – Espectro de FTIR do β -TCP sinterizado a 800 °C.	43
Figura 3.9 – Imagens de TEM dos pós de β -TCP sinterizados a 800 °C.	44
Figura 3.10 – Esquema da nucleação e crescimento do β - <i>TCP</i> (adaptado de (Sanosh, 2010)).	45

Figura 3.11 – Imagens de SEM do sal esférico produzido, com diferentes condições.	46
Figura 3.12 – Imagens de SEM das estruturas de sal densificadas sinterizadas a 755 °C	48
Figura 3.13 – Compósito HA/PCL (18%)	50
Figura 3.14 – Espuma após a sinterização	51
Figura 3.15 – Imagens de SEM de espumas sinterizadas	51

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Exemplos de tipos de ligação dos tecidos com os biomateriais (adaptado de (Hench, 1997))	3
Tabela 1.2 – Propriedades biológicas dos fosfatos de cálcio mais relevantes (adaptado de (Dorozhkin, 2002) (Bronzino, 2008)).	6
Tabela 3.1 – Tamanho da cristalite em função do tempo de envelhecimento, para os pós de HA com uma temperatura de sinterização de 800 °C.	33
Tabela 3.2 – Tamanho da cristalite em função do tempo de envelhecimento, para os pós de HA com uma temperatura de sinterização de 600 °C.	35
Tabela 3.3 – Tamanho da cristalite em função do tempo de envelhecimento, para os pós de HA com uma temperatura de sinterização de 700 °C.	37
Tabela 3.4 – Tamanho da cristalite em função da temperatura de sinterização, para os pós de HA com um envelhecimento de 48 horas.	38
Tabela 3.5 – Tamanho da cristalite em função da temperatura de sinterização, para os pós de β - TCP.	41
Tabela 3.6 – Concentrações dos vários constituintes das espumas.	50

Lista de acrónimos

BCP – *Biphasic calcium phosphate* – fosfato de cálcio bifásico

CaP – Fosfato de cálcio

CENIMAT - Centro de Investigação de Materiais

DRX – Difracção de Raios X

DSC – *Differential scanning calorimetry* – Calorimetria diferencial de varrimento

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia

FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy* – Transformada de Fourier

HA - Hidroxiapatite

IST – Instituto Superior Técnico

IV – Infravermelho

MO – Microscópio óptico

PCL - Policaprolactona

PE - Polietileno

PLA - *Polylactic acid* - Ácido Polilactico

PLGA - *Poly lactic-co-glycolic acid* - ácido poliláctico- glicólico

SEM - *Scanning electron microscope* – Microscópio electrónico de varrimento

B-TCP – β -*Tricalcium Phosphate* – β -Fosfato tricálcico

TEM – *Transmission electron microscope* – Microscópio electrónico de varrimento

Capítulo 1

Introdução

1.1 Enquadramento

O osso é um compósito formado por uma fase orgânica, o colagénio e uma fase inorgânica, constituída por cristais de hidroxiapatite. Quando ocorre uma fractura óssea, o corpo humano nem sempre tem uma panóplia de respostas que permita a cicatrização rápida e eficiente. Assim a Engenharia de Tecidos tornou-se uma área extremamente importante, na reconstrução óssea, respondendo com eficácia aos problemas apresentados. Neste contexto, os implantes de fosfatos de cálcio, permitem que o tempo de cura seja menor, do que com outro tipo de implante. O osso interage quimicamente com o implante, formando ligações químicas no espaço entre o osso e o revestimento.

Os fosfatos de cálcio como a hidroxiapatite e β -fosfato tricálcico têm sido amplamente utilizados com sucesso na fabricação de substitutos ósseos, devido à sua biocompatibilidade e bioactividade. O tamanho nano dos fosfatos de cálcio, com estequiometria apropriada, alta pureza e cristalinidade são alvo de muitas pesquisas, devido à sua densificação reforçada, osteointegração e bioactividade.

A hidroxiapatite promove ligações químicas directas com o osso, tem uma baixa taxa de reabsorção, e é apropriada para aplicações clínicas a longo prazo, enquanto o β -fosfato tricálcico possui uma taxa de reabsorção mais elevada.

Os fosfatos de cálcio foram produzidos através do método sol-gel. Este método apresenta vantagens cruciais relativamente a outros métodos, tais como: composição homogénea, temperatura de síntese baixa quando comparada com outros processos, produto com elevada pureza e a capacidade de gerar partículas de tamanho nano, importante para uma melhor reacção de contacto e estabilidade na interface implante/osso.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O principal objectivo do trabalho era desenvolver novos substitutos ósseos à base de pós cerâmicos porosos, para colmatar a insuficiência de resposta dos substitutos ósseos actualmente disponíveis no mercado; face a isto surge a necessidade de um substituto com características mecânicas melhores e mais poroso, com vantagens na sua aplicação.

A presente tese estrutura-se em 4 capítulos:

A introdução no presente capítulo, onde é feito uma contextualização do trabalho desenvolvido. Apresenta-se uma pequena reflexão sobre o que são os biomateriais, em particular os biocerâmicos e a sua versatilidade. Desenvolve-se um subcapítulo para os fosfatos de cálcio, que é o biomaterial utilizado ao longo do trabalho. Faz-se uma pequena abordagem da relação do osso com o implante. O capítulo termina com um aprofundamento das técnicas de produção aplicadas no trabalho laboratorial, o método sol-gel e a produção de espumas.

O capítulo 2 dá a conhecer os procedimentos experimentais utilizados no laboratório e apresenta os processos de caracterização utilizados.

O capítulo 3 contempla a apresentação dos resultados e discussão.

O capítulo 4 finaliza o trabalho, são apresentadas as conclusões e as perspectivas futuras para possíveis desafios e sucessos na aplicação dos materiais aqui produzidos.

1.2 Biomateriais

O progresso da Medicina permitiu que o tempo médio de vida das pessoas aumentasse. Este progresso trouxe uma crescente demanda de materiais para o corpo humano e que estão em contacto com fluidos biológicos, que são conhecidos como biomateriais. Existe uma enorme variedade de materiais que são usados clinicamente, como componentes de implantes ou como dispositivos de diagnóstico ou mesmo como terapia (Barbucci, 2002).

Os biomateriais são sistemas que criam uma interface com os sistemas biológicos e que são usados para avaliar, tratar, aumentar ou substituir um tecido, um órgão ou uma função do corpo. A principal diferença entre os biomateriais e as outras classes de materiais é a capacidade de permanecer num ambiente biológico sem o danificar e sem se danificar.

Os biomateriais estendem-se a um enorme universo de materiais. Estes podem ser classificados pela composição química ou pelo comportamento biológico.

Relativamente à composição química podem ser classificados como metais, cerâmicos, polímeros ou compósitos. O comportamento biológico, resposta do biomaterial ao tecido, pode ser classificado em bioinerte, biotolerante, bioactivo e reabsorvível, tabela 1.1.

Os biomateriais são diferentes dos materiais biológicos, os primeiros são produzidos para serem aceites pelos tecidos vivos, enquanto os últimos são produzidos por sistemas biológicos (algodão, osso humano, quitina) (Dorozhkin, 2010).

Tabela 1.1 – Exemplos de tipos de ligação dos tecidos com os biomateriais (adaptado de (Hench, 1997))

Tipos de ligação dos tecidos com os biomateriais		
Tipo de implante	Tipo de ligação	Exemplo
Biotolerante	Ligação mecânica (fixação morfológica)	Metais, alumina, zirconia, Polietileno (PE)
Poroso	Crescimento dos tecidos nos poros	Hidroxiapatite, revestimentos de HA em próteses metálicas, espumas poliméricas
Bioactivo	Interface das ligações com os tecidos (fixação bioactiva)	Vidros bioactivos, HA, vidros/cerâmicos bioactivos
Reabsorvível	Substituição com tecidos	TCP, polylactic acid (PLA)

1.3 Biocerâmicos

Nas últimas cinco décadas, os cerâmicos tornaram-se cruciais na medicina, transformando-se numa ferramenta fundamental para uma melhor qualidade de vida. São utilizados para reparação e reconstrução de partes danificadas do esqueleto humano. Esses cerâmicos são conhecidos como Biocerâmicos (Hossein, 2007).

Os Biocerâmicos são composições especiais dos materiais cerâmicos na forma de pós, revestimentos ou dispositivos médicos (tais como matrizes porosas). Na Engenharia de Tecidos, são usados para reparar, aumentar ou substituir tecidos danificados, como os ossos, articulações ou dentes. O uso dos biocerâmicos na Medicina encontra-se em ascensão, devido ao elevado fracasso da utilização de dispositivos metálicos ou poliméricos. O comportamento biológico dos biocerâmicos, depende da composição, da cristalinidade, da espessura do revestimento e do tamanho das partículas (Hench, 1997).

Existem duas possibilidades para a substituição de tecidos: o transplante e o implante. Os biocerâmicos são extremamente vantajosos como implantes, devido à disponibilidade, reprodutibilidade, fiabilidade, e não representam uma ameaça viral ou bacteriana ao paciente (Hossein, 2007; Barbucci, 2002).

Os biocerâmicos podem ser classificados segundo a interactividade biológica com os tecidos vivos, como bioinerte, bioactivo e reabsorvível.

Os biocerâmicos inertes não exercem qualquer tipo de influência sobre os tecidos e não são influenciados por eles. Como exemplo, de biocerâmicos inertes, a alumina e o zircónio.

De um modo geral a sua principal função é sustentar altas cargas mecânicas.

São essencialmente utilizados para produzir peças de conjunto de próteses, como a cabeça de uma prótese de anca ou placas para prótese de joelho. Os biocerâmicos mais adequados para este propósito são a alumina e o zircónio.

Os cerâmicos bioactivos, têm a capacidade de interagir com os tecidos biológicos e serem influenciados por estes (Barbucci, 2002). Neste trabalho foram sintetizados fosfatos de cálcio, que são os constituintes inorgânicos mais importantes dos tecidos biológicos duros, sendo um excelente exemplo de biocerâmicos bioactivos (Hossein, 2007).

Os implantes bioactivos formam uma forte ligação mecânica com o osso que depende do tipo e da capacidade de resposta do tecido no implante. A ligação estabelecida depende muito da composição da microestrutura dos materiais.

No osso, a bioactividade de um material pode ser subdividida em osteocondução e osteoindução.

Nos biocerâmicos osteocondutores a ligação do implante ao osso é lenta, não há aumento da proliferação óssea e não há ligação aos tecidos conjuntivos moles. A cinética das reacções que ocorre na superfície e a dissolução dos iões influencia a resposta das células (Hench, 1997).

A osteoindução consiste na habilidade de induzir formação de osso num ambiente não ósseo, isto é, num ambiente onde o tecido ósseo é inicialmente ausente, como músculo ou tecido sub-cutâneo, figura 1.1 (Bronzino, 2008).

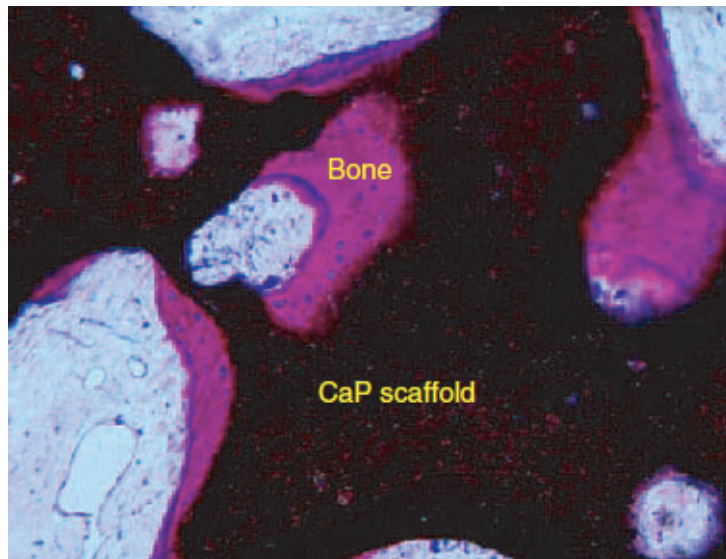


Figura 1.1 Imagem microscópica, de um *scaffold* de fosfato de cálcio macroporoso, implantado no músculo de cabra. Ao fim de 12 semanas, mostra a formação do osso a roxo escuro (Bronzino, 2008).

1.4 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio estão presentes nos ossos, nos dentes e tecidos calcificados. Nas extremidades dos tendões podem aparecer depósitos calcificados, mas isso não significa que façam parte da sua constituição habitual, dando a estes estabilidade, rigidez e função. A presença dos fosfatos de cálcio nos vertebrados, torna este composto extremamente importante na biomedicina, dado que muitas doenças resultam de irregularidades da estrutura óssea ou dos dentes. É importante salientar que embora a presença de fosfatos de cálcio seja essencial nestes tecidos duros, crucial para a sua sobrevivência, há períodos em que os minerais destes cristalizam de maneira irregular, em zonas indesejadas, como exemplo nas artérias (Dorozhkin, 2010).

O fosfato mais utilizado é a hidroxiapatite e em alguns casos, o fosfato tricálcico. A principal aplicação dos fosfatos de cálcio sintetizados surge no osso, onde há uma componente mineral cuja composição química é semelhante à hidroxiapatite, que permite a sustentação ou reparação óssea. Os fosfatos de cálcio, em particular a hidroxiapatite deram início a estudos sobre biocerâmicos em aplicações cirúrgicas no osso. Pelo facto da resistência mecânica não ser muito alta, as aplicações de implantes com base nos fosfatos de cálcio, apesar de muitas, são limitadas aos sectores de implantes de esqueleto, onde cargas consideravelmente altas não estão envolvidas. Uma das muitas aplicações possíveis é o revestimento de próteses metálicas com hidroxiapatite (Barbucci, 2002).

Existe uma enorme variedade de fosfatos de cálcio, que diferem na fórmula estequiométrica. Os parâmetros essenciais são a razão molar Ca/P e a solubilidade (tabela 1.2). Esta razão pode variar

entre 0,5 e 2; quanto menor for o rácio, mais ácido e solúvel é o fosfato de cálcio na água (Dorozhkin, 2010).

A maior parte dos componentes cristalizados têm várias fases de cristalização. As fases cristalizadas podem assumir diferentes nomes, em que esse nome pode vir associado ao produto químico em causa.

Tabela 1.2 – Propriedades biológicas dos fosfatos de cálcio mais relevantes (adaptado de (Dorozhkin, 2002) (Bronzino, 2008))

Ca/P	Composto	Fórmula	Solubilidade a 37 °C
1,0	Hidrogenofosfato de cálcio diidratado (DCPD)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	~0,088
1,0	Hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA),	$CaHPO_4$	~0,048
1,33	Fosfato de octacálcio (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	~0,0081
1,5	α - Fosfato tricálcio (α -TCP)	$\alpha - Ca_3(PO_4)_2$	~0,0025
1,5	β -Fosfato tricálcio (β -TCP)	$\beta - Ca_3(PO_4)_2$	~0,0005
1,67	Hidroxiapatite (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$	~0,0003

1.4.1 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$) é um biocerâmico inorgânico. Os cristais de 25-50 nm HA são a essência do osso, em que as propriedades mecânicas e resorbabilidade desempenham um papel importante na formação de biominais. As partículas nano da HA têm características peculiares, como biocompatibilidade melhorada, bioatividade e boa estrutura flexível. Assim, tem sido desenvolvida uma extensa investigação para desenvolver aplicações médicas devido à sua biocompatibilidade e propriedades bioactivas, a HA tem a capacidade de interagir quimicamente com o osso in vitro e in vivo (Feng, 2005) (Costescu, 2010).

É o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel (tabela 1.2). A HA pura cristaliza num grupo espacial monoclinico $P2_1/b$. Contudo, a temperaturas superiores a 250 °C, há uma transição de fase de monoclinica para hexagonal, figura 1.2.

Pertence a uma família de composições homólogas, cristalizando no mesmo grupo espacial, definida como apatites. O grupo OH^- pode ser substituído por exemplo por F^- ou Cl^- , sendo obtida fluoroapatite e cloroapatite respectivamente (Barbucci, 2002). Estas substituições parciais, consideradas impurezas, podem estabilizar a estrutura hexagonal da HA à temperatura ambiente.

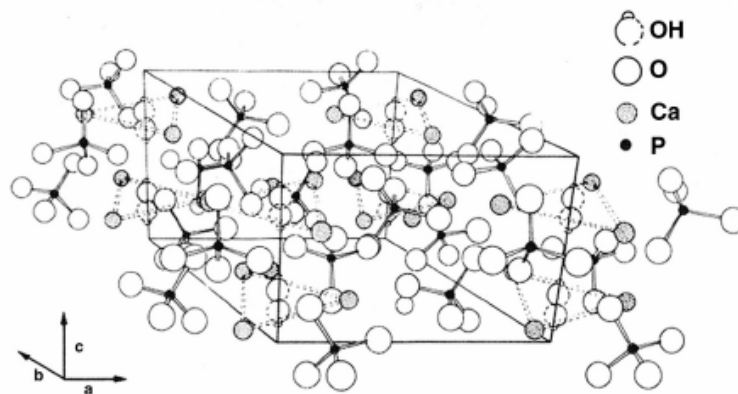


Figura 1.2 – Estrutura tridimensional da Hidroxiapatite (Park, 2008).

A *HA* pura nunca ocorre em sistemas biológicos; no entanto, por causa das semelhanças químicas com o osso mineral, esta é amplamente utilizada em ortopedia ou odontologia (Dorozhkin, 2002). Estequiometricamente, a hidroxiapatite é muito estável até 1400 °C.

As impurezas têm um papel importante ao longo das transformações térmicas da hidroxiapatite. Há dois tipos de impurezas: impurezas iônicas e fases estranhas.

Nas impurezas iônicas, algumas espécies iônicas podem atravessar a rede e tomar o lugar de cada um dos três grupos: cátions Ca^{2+} , fostatos PO_4^{3-} e hidroxilo OH^- . Cada tipo de substituição vai modificar o comportamento da apatite resultante, alterando as propriedades químicas e estabilidade térmica. Na evolução térmica, as impurezas iônicas podem levar à formação fases de fosfatos.

As fases estranhas podem ocorrer na fase inicial de produção dos pós ou podem-se desenvolver como resultado da decomposição térmica de diferentes fosfato (Barbucci, 2002).

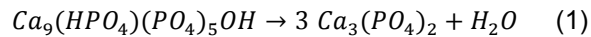
1.4.2 β -fosfato tricálcico

O β -fosfato tricálcico (β -tricalcium phosphate, $\beta - TCP$) é considerado o verdadeiro fosfato de cálcio. Apresenta uma razão Ca/P de 1,5 [$Ca_3(PO_4)_2$].

O facto de ser reabsorvível é uma vantagem significativa do $\beta - TCP$, quando comparado com outros fosfatos que não são reabsorvíveis (Gibson, 2000).

Para produzir um *scaffold* de $\beta - TCP$ (sinterizado ou composto com polímero) é fundamental que tenha uma elevada resistência mecânica. Assim, o controlo da morfologia e tamanho de partícula do $\beta - TCP$ é fundamental nas suas aplicações (Sanosh, 2010).

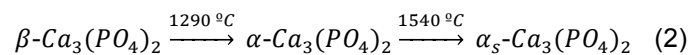
Este fosfato de cálcio não pode ser sintetizado através de uma solução, mas só depois de sinterizado, a partir dos 800 °C (equação1):



Apesar do β – TCP apresentar uma fase estável à temperatura ambiente, é menos solúvel em água que o α -TCP. β – TCP puro nunca ocorre na calcificação biológica, só na forma com magnésio, *whitelockite* (β – $(Ca, Mg)_3(PO_4)_2$), encontrado nas cáries dentárias, artroses, depósitos de tecidos moles, cálculos renais e tártaro.

Na Medicina, o β – TCP é utilizado como um cimento de fosfatos de cálcio, em combinação com a HA, surgindo o fosfato de cálcio bifásico (Biphasic calcium phosphate – BCP), como substituto ósseo (Dorozhkin, 2002).

O fosfato tricálcico pode ocorrer à temperatura ambiente depois da sintetização pelo processo de sol-gel. Em qualquer caso, a única fase que existe numa temperatura abaixo dos 680-720 °C é o β – TCP, estável à temperatura ambiente. A transformação do β – TCP é dada por (equação 2):



A última fase α_s difere da anterior α porque adquire uma organização molecular que origina uma rede superestrutural. A transformação da fase β em α não aparece necessariamente à temperatura da transformação. Na presença de outros fosfatos, como a hidroxiapatite, pode ocorrer fase alotrópica α -TCP mesmo a baixo de 650 °C, como fase secundária e em pequena percentagem (Barbucci, 2002).

1.4.3 Os fosfatos de cálcio e a Engenharia de Tecidos

Durante muito tempo, as aplicações médicas do fosfatos de cálcio encontravam-se limitadas devido ao facto de serem frágeis, impedindo o suporte de cargas elevadas.

Actualmente com a evolução da engenharia de tecidos, os fosfatos de cálcio são muito utilizados em áreas como a ortopedia e a medicina dentária. São aplicados como substitutos ósseos, em revestimentos, cimentos, sistemas de libertação controlada de fármacos, *scaffolds*, e na substituição de dentes.

A sua biocompatibilidade, segurança, química bem conhecida, disponibilidade ilimitada, e custo/eficácia representam importantes vantagens sobre os auto-enxertos e aloenxertos, tornando-os uma boa escolha para a cirurgia reconstrutiva, ortopedia, odontologia, cirurgias maxilo e craniofaciais e neurocirurgia (Lobo, 2010).

A necessidade de biocerâmicos para cirurgia minimamente invasiva tem levado ao desenvolvimento de cimentos de fosfatos de cálcio, para serem aplicados como substitutos ósseos; estes apresentam semelhanças com o tecido ósseo, uma relativa facilidade de processamento e boa adesão celular. Quando o injectável endurece, quando contém algo que polimeriza, este pode ser facilmente utilizado pelas células para a reconstrução dos ossos danificados.

Relativamente aos revestimentos, os fosfatos de cálcio foram importantes pois permitiram uma melhoria da união entre o metal e osso. Como nos metais não há união óssea, os fosfatos de cálcio foram essenciais para ligações mecanicamente estáveis entre o implante e o tecido ósseo (Dorozhkin, 2010).

1.5 Osso/implante

O osso é a maior calcificação presente no corpo humano, tem uma função estrutural de suporte para o corpo e é o maior reservatório de íons de fosfato e cálcio, necessários para uma enorme variedade de funções metabólicas. Do ponto de vista estrutural, o osso é um material compósito à base de fosfatos de cálcio e colagénio. O colagénio confere ductilidade e tenacidade, enquanto os fosfatos de cálcio são responsáveis pela rigidez. A combinação destas características dá ao osso uma alta resistência mecânica e alguma capacidade de deformação. Os fluidos presentes no osso agem como plastificantes. A porosidade do osso é uma propriedade extremamente importante, permite que os fluidos corporais e as células acessem a várias regiões do tecido ósseo.

O osso é composto por uma parte exterior relativamente densa, o osso cortical ou compacto, e uma parte mais interna composta por osso menos denso, tecido poroso (esponjoso), que é preenchido pelo osso medular, semelhante a um gel (Dorozhkin, 2002).

O osso encontra-se constantemente em remodelação. Os osteoblastos produzem e mineralizam uma nova matriz óssea, os osteoclastos reabsorvem a matriz.

Os osteoblastos secretam colagénio, após isso, revestem proteínas sem colagénio, que tem a capacidade de “aproximar” os minerais, na maioria o cálcio e os fosfatos, a partir da corrente sanguínea, formando o osso novo (Bigi, 1997).

Em aplicações médicas, como a cranioplastia, a reabsorção lenta do implante e substituição pelo osso é bastante aceitável, utilizando a *HA*. Em situações como a doença periodontal, a reabsorção do implante tem que ser mais rápida, como o β -*TCP* tem solubilidade e biodegradação mais elevadas que a *HA*, é mais útil nestas situações e a formação do osso novo é mais rápida (Sanosh, 2010).

As fracturas ósseas podem demorar algum tempo a cicatrizar devido a condições de diversa natureza, nomeadamente a saúde do paciente. Assim surge a necessidade de efectuar implantes. Sempre que este recurso é utilizado, o primeiro tecido a entrar em contacto com o mesmo é o tecido sanguíneo. Quando no implante o revestimento é de *HA* o tempo de cura é menor, do que com outro tipo de implante. Devido à estrutura química da *HA*, o osso interage quimicamente com o implante, construindo ligações químicas no espaço entre o osso e o revestimento (Luz, 2009).

1.6 Método Sol-Gel

Para sintetizar *HA* têm sido desenvolvidas diversas técnicas de síntese; síntese mecânico-química, por combustão, técnicas de química húmida, como a precipitação, deposição electroquímica, método sol-gel ou emulsão (Feng, 2005).

Apesar da técnica mais frequentemente utilizada para sintetizar a Hidroxiapatite ser a técnica de precipitação, esta é desvantajosa, porque há necessidade de um controle da temperatura e pH.

A síntese dos biocerâmicos através do processo sol-gel é mais vantajosa permitindo o controlo mais fácil dos parâmetros do processo. Ocorre uma homogeneidade da solução, através da mistura dos dois líquidos, a mistura homogénea (estequiometria correcta), assegura um grau de pureza muito mais elevado. A temperatura de síntese é baixa, quando comparada com métodos tradicionais de síntese de pós de cerâmicos.

O sol-gel permite obter partículas de dimensão nano. Esta escala é óptima porque permite melhorar a reacção de contacto e a estabilidade na interface osso/implante.

1.6.1 Fases do Sol-Gel

O método sol-gel engloba cinco fases fundamentais, figura 1.3:

- a) formação do sol;
- b) formação do gel;
- c) envelhecimento;
- d) secagem;
- e) sinterização;

Formação do sol

Existem diversos tipos de soluções de partida ou precursoras, que se classificam com base nas suas propriedades físicas, contudo a solução precursora mais usual é o sol.

O sol é constituído por uma solução que tem a particularidade de ser uma suspensão coloidal, em que a fase dispersa é tão pequena (tamanho das partículas entre 1 nm e 1000 nm) que as forças gravitacionais são negligenciáveis. Dependendo do precursor, o sol ou solução inicial pode ser obtido em diversos solventes (Franco, 2009).

Formação do gel

Um gel é uma rede tridimensional interligada, rígida e porosa, que se pode expandir de forma estável, somente limitado pelo recipiente utilizado, ao longo de uma fase líquida.

A continuidade da estrutura sólida dá elasticidade ao gel.

O gel é formado quando se dá a gelificação do sol ou da solução de partida, estas são transformadas numa solução coloidal ou polimérica, há a formação de agregados fractais que crescem, começam a colidir uns com os outros (perto das ligações do ponto de gel), formando-se aglomerados quase estacionários que acabam por se ligar, construindo assim uma rede (teoria da percolação) (Brinker, 1990) (Franco, 2009).

O tipo de ligação que se forma com o gel não é uma característica particular, dado que para géis poliméricos formam-se ligações covalentes e para géis coloidais ligações de Van der Waals; as ligações podem ser reversíveis no caso de um sistema coloidais e irreversíveis nos poliméricos.

Envelhecimento

No processo sol-gel o envelhecimento é importante pois actua como factor de mudança na estrutura e propriedades após a gelificação.

O envelhecimento contempla as seguintes fases: condensação, dissolução e precipitação, ou transformações de fase dentro da fase sólida ou líquida.

Alguns géis diminuem de tamanho de forma espontânea, designando-se de sinérese, com a formação de uma ligação ou atracção entre as partículas induzidas pela contracção da rede e libertação dos líquidos dos poros (Brinker, 1990).

Secagem

A diminuição de tamanho do gel pode ocorrer durante a sínereze (no envelhecimento) ou quando o solvente evapora na secagem, ocorrendo deformação na rede e transporte de líquido através dos poros.

A secagem por evaporação sob condições normais origina uma pressão capilar que reduz a rede do gel; o gel resultante designa-se por xerogel, onde ocorre uma redução de volume de um factor entre 5 a 10 do gel húmido.

Se porventura o gel húmido é colocado num autoclave e seco sob condições supercríticas não vai existir uma interface entre o líquido e o vapor; assim sendo não ocorre pressão capilar e a redução do gel é relativamente pequena. Este processo é designado de secagem supercrítica e o gel resultante é um aerogel (Brinker, 1990).

Sinterização

A maior parte dos géis são amorfos, mesmo após a secagem. Assim, surge a necessidade de os aquecer para poderem cristalizar.

Se o objectivo do método sol-gel é produzir um cerâmico com poros livres, é necessário que o aquecimento a que o gel é submetido tenha uma temperatura suficientemente alta para provocar a sinterização.

A sinterização é um processo de colapso dos poros impulsionados pela energia de superfície.

Nos materiais amorfos, o transporte de átomos ocorre devido a um fluxo viscoso e o processo é designado por sinterização viscosa; nos materiais cristalinos a sinterização envolve difusão (Brinker, 1990).

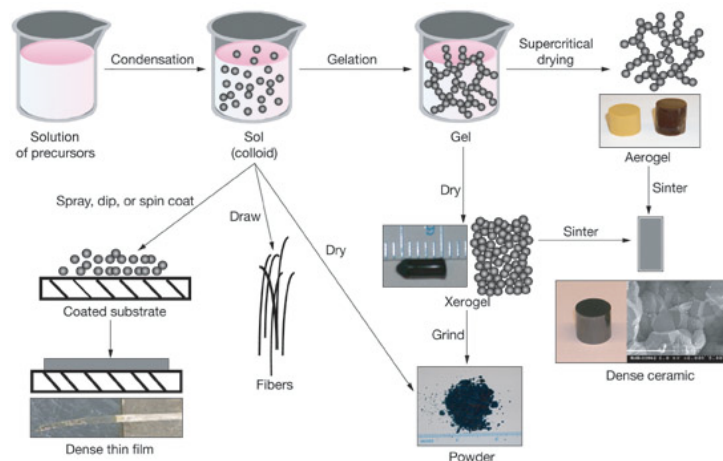


Figura 1.3 – Representação esquemática do Processo Sol-Gel (Rath, 2005)

1.7 Espumas

Existe um grande interesse da Engenharia de Tecidos em materiais tridimensionais porosos (espumas). As espumas apresentam propriedades vantajosas, tais como baixa densidade, baixa condutividade térmica, estabilidade térmica, e boa resistência mecânica (Bao, 1999).

As espumas cerâmicas podem ser produzidas por diferentes métodos:

- método de replicação: as espumas poliméricas são impregnadas, em suspensões cerâmicas com ligantes apropriados, seguido de uma sinterização a temperaturas elevadas (Ranito, 2009);
- deposição química em fase de vapor de cerâmico sobre um substrato de carbono poroso;
- processo sol-gel que desenvolve a porosidade durante as transformações de fase nas reacções químicas (ver referência folhas);
- processo de vazamento de um gel conjuntamente com um polímero disperso numa suspensão cerâmica, seguido de uma polimerização *in-situ*;
- uma técnica baseada na utilização sacrificial de partículas porogéneas – a lixiviação (*salt leaching*).

A porogénese é uma abordagem frequente quando o objectivo de um trabalho é produzir espumas. O processo utilizado neste trabalho foi a lixiviação, usando sal como porogéneo.

Além da lixiviação, pode ser utilizado o *freeze casting*, *gas foaming*.

A lixiviação de sal está limitada ao uso de polímeros. Em primeiro lugar, o polímero é dissolvido num solvente orgânico adequado, para o *PCL* (é frequente utilizar o clorofórmio), a solução é colocada em contacto com partículas de um porogéneo, um sal inorgânico, como por exemplo o cloreto de sódio. O tamanho das partículas do porogéneo irá afectar o tamanho das partículas da *scaffold*. A proporção polímero/porogéneo está directamente relacionada com a porosidade da estrutura final. Após a solução de polímero estar fundida, o solvente começa a evaporar. Quando o solvente evapora completamente, a espuma é imersa num banho adequado para dissolver o porogéneo, a água no caso do cloreto de sódio. Após o porogéneo ser completamente dissolvido, é obtida uma estrutura porosa (Khang & Kim, 2007).

Os poros da espumas são ditados pelo tamanho do sal.

Segundo Gross (Gross, 2004), a lixiviação é uma abordagem simples, mas é limitada no controlo das formas dos poros e na conectividade. Este problema pode ser contornado colocando as partículas de sal num ambiente húmido (Murphy, 2002) ou por sinterização (Rosa, 2002) (Liu, 1997).

Liu (Liu, 1997) verificou que o tempo de sinterização tem um papel importante no controlo da microporosidade nas paredes da espuma, e portanto com a distribuição do tamanho dos poros.

No esforço de mimetizar a estrutura do osso, as pesquisas na área das espumas cerâmicas têm sido orientadas no sentido de produzir materiais compósitos à base de fosfatos de cálcio.

Esses compósitos são constituídos pelo polímero e pelo cerâmico.

Uma espuma cerâmica apresenta alguns problemas, como a degradabilidade do material e as propriedades mecânicas (resistência à tracção e fragilidade).

A adição de polímeros biodegradáveis conduz a um compósito absorvível e com melhores propriedades mecânicas. O polímero utilizado no trabalho foi o *PCL*.

O *PCL* é interessante devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (embora baixa).

Devido à biodegradabilidade, uma espuma pode ser formulada na medida que as propriedades de degradação são adaptadas à aplicação final.

No compósito *PCL*/cerâmico as partículas de cerâmico são adicionadas ao polímero para torná-lo osteocondutor e para melhorar as propriedades mecânicas. Estas espumas podem ser porosas ou densas. Na Engenharia de Tecidos é essencial que a *scaffold* seja porosa.

Mondrinos (Mondrinos, 2006) investigou um compósito poroso de *PCL* com 10/20 % de partículas de fosfatos de cálcio. Comparando com o *PCL* puro, a resistência destes *scaffolds* aumentou drasticamente. Células embrionárias humanas foram implantadas nestes compósitos, resultando num aumento da proliferação destes em 20 % nos compósitos *CaP*.

A adição de células aos compósitos cerâmico/polímero normalmente não apresenta dificuldade, especialmente quando polímeros como *PCL* são usados devido ao facto de degradarem lentamente.

Polímeros com degradação mais rápida, como por exemplo *PLGA*, não são tão bons porque podem ocorrer reações citotóxicas devido à degradação em produtos ácidos (Habraken, 2007).

As principais características de um *scaffold* são o tamanho médio dos poros, a distribuição do volume destes, a interligação dos poros, a forma deles, o tamanho mínimo médio do poro e a sua rugosidade. Para produzir um *scaffold* com boas propriedades é fundamental apresentar tais características. O poro tem que ter um tamanho mínimo para facilitar o crescimento do tecido e a interconectividade é essencial para o acesso aos nutrientes e para transportar os produtos desperdiçados. A forma dos poros e a rugosidade melhoram a propagação celular (Gross, 2004).

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Síntese da hidroxiapatite pelo método Sol-Gel

Para a produção de HA foi utilizado o método Sol-Gel, descrito por *Feng et al* (Feng, 2005) com pequenas alterações.

Utilizaram-se como precursores, o Pentóxido de Fósforo e o Nitrato de Cálcio tetrahidratado, com uma razão molar Ca/P=1,67. Na figura 2.1 pode ser observado um esquema com os principais passos da síntese dos pós de HA.

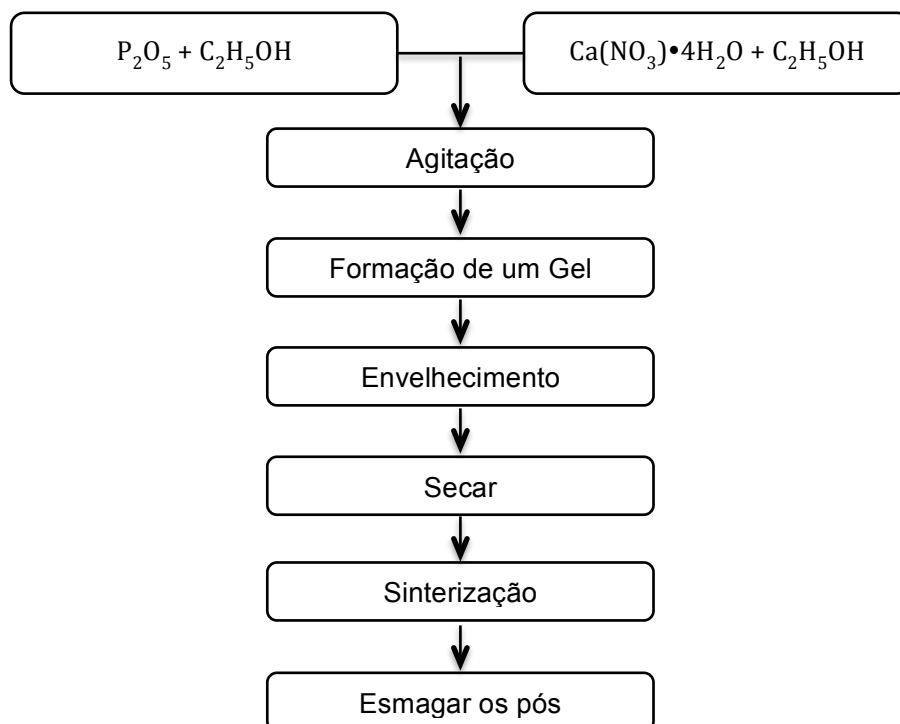


Figura 2.1 – Esquema da síntese da HA.

2.1.1 Materiais

- Pentóxido de Fósforo (P_2O_5), Sigma – Aldrich
- Nitrato de Cálcio tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$), Panreac
- Etanol (C_2H_5O), Panreac

2.1.2 Procedimento experimental

1. Dissolveu-se 15,775 g de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ em 20 mL de Etanol.
2. Colocou-se a solução sob agitação à temperatura ambiente, até o soluto estar dissolvido.
3. Dissolveu-se 2,839 g de P_2O_5 em 20 mL de Etanol. Como há libertação de vapores tóxicos houve uma especial atenção e procedeu-se à adição do solvente lentamente na hotte. Os vapores resultam do ácido ortofosfórico que na forma gasosa resulta da reacção entre as moléculas de água do etanol não anidro e o pentóxido de fósforo. (NCMN)
4. Repetiu-se o passo 2.
5. Procedeu-se à mistura das duas soluções (solução precursora de cálcio e da solução precursora de fósforo).
6. A mistura permaneceu em agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente.
7. Colocou-se a mistura resultante num banho de glicerina a 65°C durante cinco horas até à formação de um gel esbranquiçado (figura 2.2) .
8. O gel foi dividido em 12 partes.
9. Após a formação do gel, 3 partes foram colocadas numa estufa a 80 °C durante pelo menos 24 horas.
10. Os géis secos foram sinterizados a 600, 700 e 800 °C; com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min , permanecendo 30 minutos na respectiva temperatura, seguidos de um arrefecimento até à temperatura ambiente.
11. Os produtos sinterizados foram esmagados com o auxílio de um almofariz e de um pilão, para obter pós mais pequenos e homogeneizar o tamanho dos pós.
12. As outras 9 partes que foram tratadas com diferentes tempos de envelhecimento 12, 48 e 72 horas respectivamente.
13. Depois do tempo do envelhecimento terminar, colocaram-se os géis numa estufa a 80 °C, durante 48 horas.
14. Repetiram-se os passos 10 e 11.



Figura 2.2 – Formação do gel.

2.2 Síntese do β -fosfato tricálcico pelo método Sol-Gel

Para sintetizar o β -TCP foi utilizado o método Sol-Gel, proposto por *Sanosh et al* (Sanosh, 2010) com ligeiras modificações.

Utilizou-se como precursor de fosfato, o Hidrogenofosfato de potássio e o Nitrato de Cálcio tetrahidratado como precursor de cálcio. Os cálculos tiveram em conta o rácio do Fosfato tricálcico 1,5. Na figura 2.3 pode ser observado o esquema com os principais passo da síntese do β -TCP.

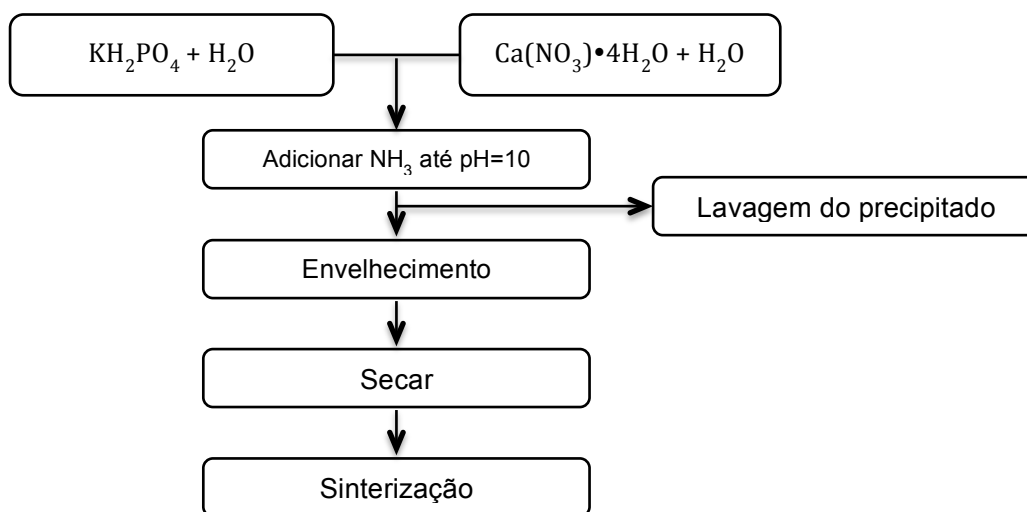


Figura 2.3 – Esquema da síntese do β -TCP

2.2.1 Materiais

- Hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), Sigma – Aldrich
- Nitrato de Cálcio tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$), Panreac
- Água destilada (H_2O)

2.2.2 Procedimento experimental

1. Dissolveu-se 6,88 g de KH_2PO_4 em 50 mL de água destilada.
2. A solução foi colocada à temperatura ambiente sob agitação até completamente dissolvida.
3. Dissolveu-se 17,71 g de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ em 50 mL de água destilada.
4. Repetiu-se o passo 2.
5. Procedeu-se à mistura das duas soluções (solução precursora de cálcio e da solução precursora de fósforo).
6. A mistura permaneceu em agitação durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
7. Registou-se o pH.
8. Adicionou-se Amoníaco (NH_3) gota a gota com uma pipeta de Pasteur. Formou-se um precipitado branco. A adição decorreu até este atingir um pH 10 (figura 2.4).
9. O precipitado ficou sob agitação durante uma hora.
10. Efectuou-se o envelhecimento do precipitado durante 48 horas, à temperatura ambiente.
11. Lavou-se o precipitado repetidamente usando água destilada morna, para remover os iões de NH_4^+ e NO_3^- . Para uma lavagem mais eficiente o precipitado foi dividido por diversos tubos de ensaio, adicionou-se a água destilada morna, centrifugou-se (figura 2.5 – B), verteu-se o sobrenadante (figura 2.5 – A).
12. Repetiu-se o passo 10 até o cheiro do amoníaco se dissipar.
13. Secou-se o precipitado a 40 °C durante 72 horas.
14. Dividiu-se o precipitado em três partes.
15. Sinterizou-se cada uma das partes a 600, 700 e 800 °C. Utilizou-se um patamar de 10°C/min, permanecendo 30 minutos na respectiva temperatura; seguido de um arrefecimento até à temperatura ambiente.
16. Os produtos sinterizados foram esmagados com o auxílio de um almofariz e de um pilão, para poder obter pós mais pequenos e homogeneizar o seu tamanho.



Figura 2.4 – Fotografia da montagem experimental

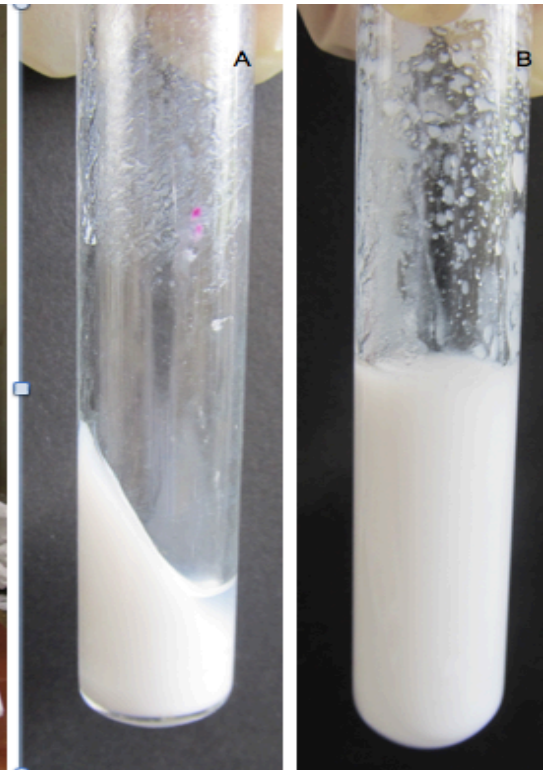


Figura 2.5 – Fotografia da lavagem do β -TCP

2.3 Produção de grãos de sal esférico

Para produzir sal esférico foi utilizado o método descrito por Jinnapart (Jinnapat, 2010) com pequenas modificações.

1. Produziu-se uma pasta de farinha (comercial) e água destilada 2 wt % (p/p).
2. Utilizou-se 20 mL dessa pasta e adicionou-se 100 g de sal de cozinha, com partículas de tamanho entre os 53 μm e 106 μm .
3. Agitou-se a pasta durante uma hora, para que ficasse bem homogênea.
4. Colocou-se a pasta no reactor com óleo cozinha, agitou-se a pasta com o auxílio de uma hélice num agitador mecânico, durante 5 minutos a 1000 rpm (figura 2.6).
5. Após os 5 minutos, iniciou-se o aquecimento, desde a temperatura ambiente até aos 80 °C, sempre sob agitação.
6. Quando se atingiu a temperatura pretendida, finalizou-se o aquecimento e a agitação; o sal depositou-se no fundo do reactor.
7. Lavou-se o sal esférico com metanol, até lhe ter sido retirado todo o óleo existente.
8. O sal permaneceu em repouso, à temperatura ambiente durante 24 horas.
9. Colocou-se o sal num exsiccador, sob vácuo, durante pelo menos dois dias.

10. Peneirou-se o sal, seleccionando as partículas com diâmetro superior a 300 μm .

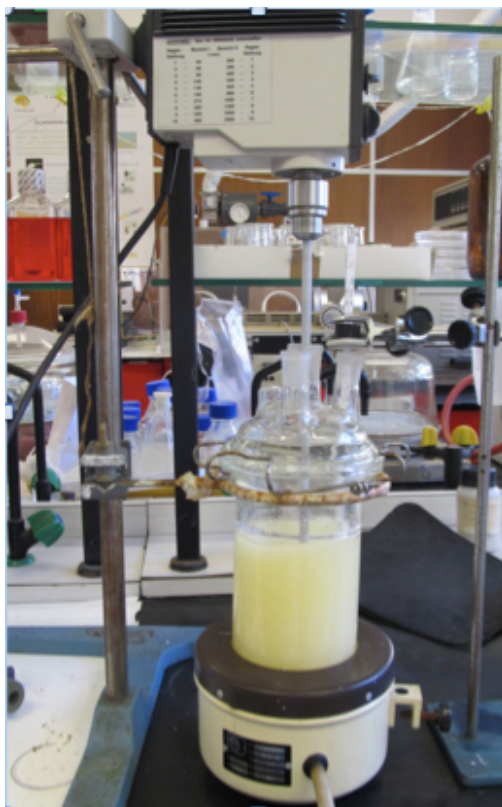


Figura 2.6 – Montagem para a preparação de grão de sal esférico

2.4 Caracterização dos pós

2.4.1 Difracção de Raios-X

A difracção de raios X (DRX) permite determinar experimentalmente as estruturas cristalinas dos materiais. Os raios X são radiações electromagnéticas com um comprimento de onda curto. Sempre que esta radiação é dirigida para um cristal, os átomos dispersam a radiação em todas as direcções. Cada átomo do cristal comporta-se como se tratasse de uma pequena fonte de raios X e quando os raios se aproximam sofrem interferência. No caso em que as ondas estão em fase, dá-se uma interferência construtiva, resultando numa onda ainda mais intensa. Quando as ondas separadas se encontram fora de fase, ocorre interferência destrutiva, não há radiação difractada (Reger, 1997).

Para que as ondas dispersadas voltem a estar em fase, figura 2.7, a distância extra percorrida pela onda de baixo deve ser um inteiro positivo (n) de comprimento de onda (λ) dos raios X:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (1)$$

onde θ é o ângulo de difracção e d é a distância interplanar. Esta equação é conhecida como a Lei de Bragg, mas só é útil quando o espaçamento entre camadas e o comprimento de onda de radiação são da mesma grandeza.

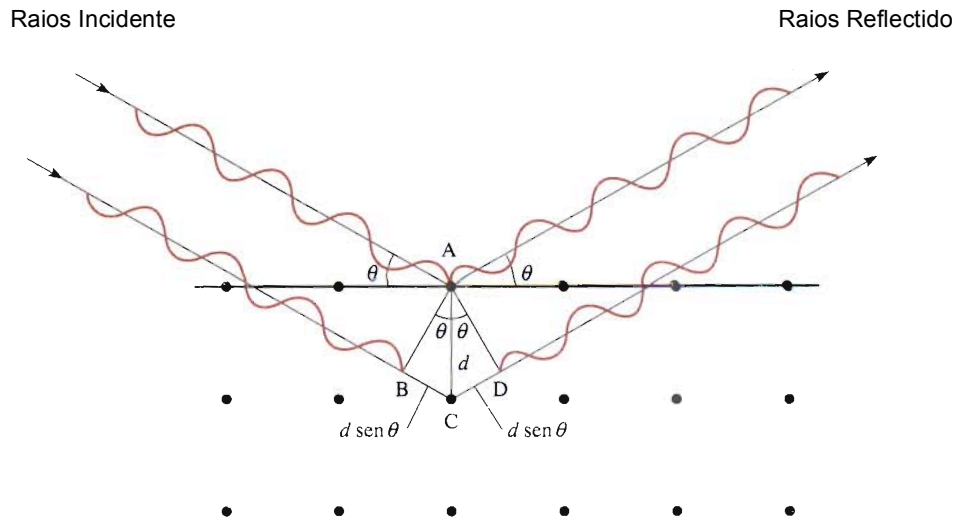


Figura 2.7 – Reflexão de raios X por duas camadas de átomos. A onda de baixo percorre uma distância que excede em $2d \cdot \sin \theta$ a distância percorrida pela onda de cima. Para que as duas ondas voltem a estar em fase, após a reflexão, a igualdade $n\lambda = 2d \cdot \sin \theta$ deve ser verdadeira (adaptado de (Chang, 2005)).

O tamanho da cristalite foi determinado através dos difractogramas das amostras analisadas, recorrendo à fórmula de *Scherrer* (HE, 2009);

$$tc(nm) = \frac{0,89\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2)$$

onde tc é o tamanho da cristalite, λ o comprimento de onda dos raios – X, β a largura do pico de difracção de maior intensidade, medida à meia altura, e θ o ângulo correspondente ao pico de maior intensidade.

As medições foram realizadas num difractómetro *X-ray diffraction PANalytical XPert PRO* (CENIMAT/I3N), apresentado na figura 2.8.

Procedimento experimental

As amostras foram caracterizadas recorrendo à difracção de raio X para poder identificar as fases cristalinas dos pós β -TCP e HA e avaliar a sua cristalinidade.

Para a análise por DRX, os pós foram previamente moídos num almofariz.

A fonte dos Raios-X do difractómetro utilizado era uma ampola de *Cu K-alpha*, com um potencial de aceleração de 45 kV e um feixe de corrente de 40 mA.

O varrimento foi feito com foco nos picos essenciais, entre 20° e 60°.

A taxa de varrimento utilizada foi de 1 segundo por cada passo de 0,033°.

A análise dos difractogramas foi realizada recorrendo à comparação com as fichas JCPDS: #09-0432, #09-0169 e #37-1497.



Figura 2.8 – Difractómetro PANalytical X'Pert PR

2.4.2 Espectroscopia de Infravermelho

A Espectroscopia de Infravermelho (FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*) é uma técnica que permite de maneira fácil comprovar a existência de vários grupos funcionais que existem num composto. Esta depende da interacção que existe entre as moléculas ou átomos com a radiação electromagnética. A interacção traduz-se na absorção de energia, sempre que uma das frequências da ligação dos átomos ou das moléculas corresponder à frequência de radiação (Morrison, 1996).

A radiação no Infravermelho permite que os átomos e grupos de átomos vibrem com uma amplitude maior à volta das ligações covalentes que os ligam (os electrões não são excitados porque a radiação no infravermelho não é suficiente para tal acontecer, isto acontece com moléculas que são submetidas a energias mais elevadas como luz no visível ou ultravioleta).

Uma molécula em constante vibração, não é passível de ser menosprezada uma vez que toda a transição vibracional ocorre juntamente com a alteração do estado de rotação da molécula.

As principais vibrações podem ser classificados em vibrações de distensão, quando os átomos se movem na direcção da ligação modificando a distância entre estes, podem ser simétricas ou anti-simétricas; e em vibrações de deformação, onde os átomos movimentam-se mas não variam as distâncias interatómicas, somente o ângulo, por exemplo a rotação.

Num espectrofotómetro de IV, o feixe de radiação IV passa através de uma amostra, comparando a radiação transmitida através da amostra com a radiação transmitida na ausência da amostra. O espectrómetro regista os resultados através de um gráfico absorvância pela frequência ou comprimento de onda.

O espectrofotómetro de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) utiliza um interferómetro de Michelson; este divide o feixe de radiação da fonte do IV de modo que reflecte simultaneamente a partir de um espelho em movimento e de um espelho fixo, levando à interferência. Depois dos feixes se recombinarem, estes passam da amostra para o detector, sendo os dados guardados num interferograma. Os comprimentos de onda e as intensidades das absorções são convertidos para um espectro onde é aplicada a Transformada de Fourier (Solomons, 2005).

Esta técnica foi utilizada com o intuito de identificar as espécies químicas que estavam presentes nos pós dos fosfatos de cálcio, e indagar se existiam possíveis alterações do produto após a sinterização.

As medições foram realizadas num espectrómetro *FT-IR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation* (CENIMAT/I3N), figura 2.9.

Procedimento experimental

Inicialmente foi traçado o “branco”, com uma amostra de Brometo de Potássio (*KBr*).

Para a análise dos pós em causa houve necessidade de preparar as amostras:

- 1- Os fosfatos de cálcio e o Brometo de Potássio (*KBr*) foram secos previamente numa estufa;
- 2- Para preparar as pastilhas com *KBr*, usou-se a relação de 1/200, pesaram-se 0,1 g de *KBr* e 0,0005 g do cerâmico que se queria analisar, e com o auxílio de um almofariz misturaram-se os dois componentes.
- 3- A amostra foi colocada no molde, e numa prensa aplicou-se uma pressão de 200 bar durante 15 minutos, para formar a pastilha.

Depois das amostras preparadas, colocou-se a amostra a analisar no suporte do aparelho. O registo foi executado na forma de gráfico, correspondendo ao espectro de infravermelho da amostra.



Figura 2.9 – Espectrómetro FT-IR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation

2.4.3 Microscopia electrónica de transmissão

O microscópio electrónico de transmissão (TEM – *Transmission Electronic Microscope*) opera com os mesmos princípios básicos que o microscópio óptico (MO), só que em vez de luz usa electrões. O TEM foi desenvolvido por causa dos limites da imagem do MO, dado que a imagem do MO é limitada pelo comprimento de onda da luz.

Este tipo de microscópio tem a capacidade de mostrar imagens ampliadas de amostras ultra finas, interagindo com estas tipicamente nas ordens de grandeza 10^3 a 10^6 . Além disso, permite ser usado para produzir padrões de difracção electrónica úteis para análise de unidades de amostras cristalinas (Egerton, 2005).

O microscópio Electrónico de Transmissão é constituído por um canhão de electrões, um sistema condensador, lente objectiva, sistema de lentes projectoras, écran de observação e captação da imagem.

O canhão de electrões funciona como uma fonte de iluminação. É gerado um feixe de electrões através da emissão de electrões a partir do tungsténio aquecido e sob vácuo.

O sistema condensador possibilita variar a intensidade da iluminação. Este sistema é formado por dois tipos de lente, o condensador 1 e 2 (figura 2.10) permitindo uma iluminação de elevada intensidade em menores áreas, à medida que se aumenta a ampliação, a área do objecto observada é gradualmente menor. O design e o modo de operação das lentes determinam o diâmetro do feixe electrónico na amostra e o nível de intensidade na imagem final de TEM.

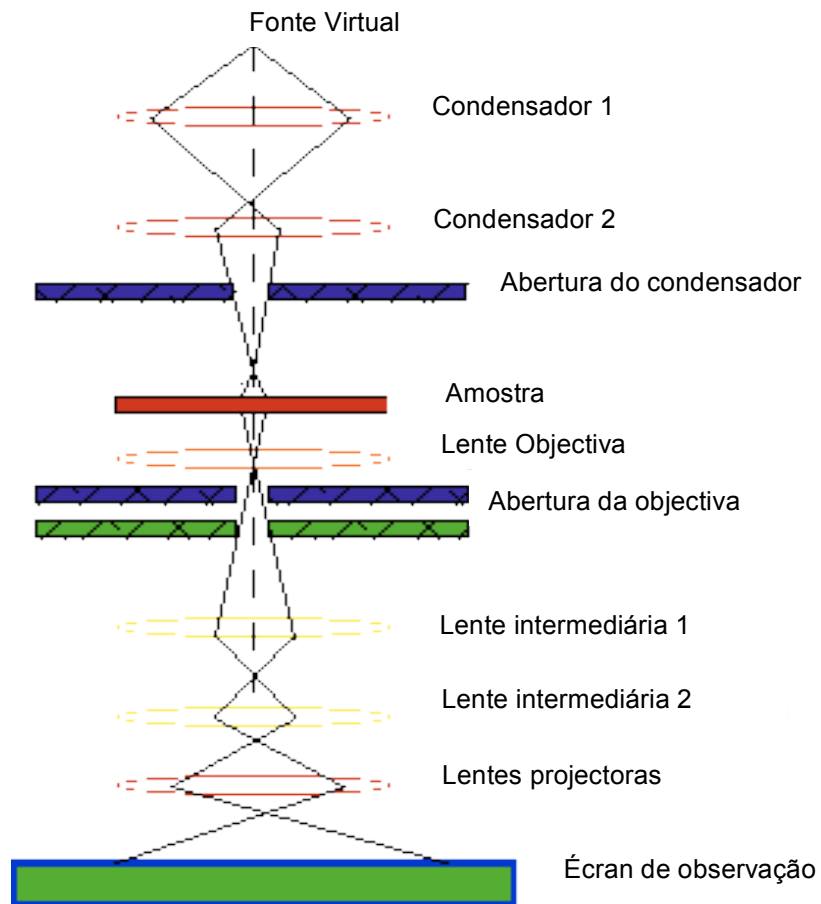


Figura 2.10 – Diagrama esquemático do microscópio electrónico de transmissão (adaptado de (NCMN)).

A lente objectiva faculta a primeira ampliação do objecto, e é o factor determinante na resolução e qualidade da imagem. Esta lente tem forte convergência, é fortemente diafragmada, e essencial para corrigir aberrações.

O sistema de lentes é formado por três tipos de lente. A ampliação final no microscópio em causa vai ser determinada pelo produto da ampliação da objectiva e de cada uma das lentes. A ampliação da imagem final pode ser alterada modificando a corrente de qualquer uma das lentes.

No écran de observação, como a imagem produzida pelo feixe de electrões não é visível ao olho humano, surge a necessidade de a converter em radiações visíveis, obtido pela fluorescência emitida através dos cristais da substância que reveste o écran ao ser atingidos pelos electrões (cristais de brometo de prata) (Salema, 1992).

A ampliação de uma imagem TEM é determinada pelo modo como o sistema de imagem é operado, enquanto o design das lentes de imagem determinam fortemente a resolução espacial que pode ser obtida no microscópio.

No âmbito deste trabalho foi usado o equipamento *Hitachi H-8100 Electron Microscope* (IST – Lisboa), figura 2.11, com a acoplação de um detector EDS para elementos leves da *ThermNoran*; para obter as imagens foi utilizada uma câmara CCD.



Figura 2.11 – *Hitachi H-8100 Electron Microscope*

Procedimento experimental

Para observar as amostras no TEM, houve necessidade de proceder à preparação das amostras. Os pós dos fosfatos de cálcio foram previamente moídos num almofariz, para observá-los, estes foram mergulhados em etanol. Utilizou-se uma agulha polimérica para depositar os pós. Foi usada uma tensão de aceleração de 200 kV.

2.5 Preparação das espumas porosas

As espumas porosas podem ser produzidas por diferentes métodos. Neste trabalho abordaram-se dois dos possíveis métodos, referidos no capítulo 1, página 13.

O processo de réplica por injeção de um polímero num substrato poroso, método A.

No método B, fez-se a replicação a partir de um substrato polimérico, que é impregnado por uma suspensão cerâmica e sujeito, no fim, a uma sinterização a elevadas temperaturas.

De forma a obter uma espuma de fosfato de cálcio com uma porosidade elevada, procedeu-se à comparação dos dois métodos, levando a cabo a caracterização da espuma.

MÉTODO A

Este método foi baseado no trabalho de Gross (Gross, 2004). As partículas de sal esférico foram previamente sinterizadas, proporcionando um *template* interconectado, que funcionou como substrato poroso.

O substrato de sal foi preenchido com uma suspensão de pós de *HA*.

Como o sal esférico foi peneirado, o uso de partículas $> 300 \mu m$ permite poros maiores.

Neste método para produzir as espumas porosas utilizaram-se os seguintes materiais:

- Os pós dos fosfatos de cálcio sintetizados neste trabalho (*HA*)
- *NaCl* ($\rho = 2,165 \text{ g/cm}^3$; sal esférico produzido)
- Policaprolactona, PCL (com peso molecular 65 000 e $\rho = 1,145 \text{ g/cm}^3$)
- Clorofórmio
- Etanol

Produção do *template* de sal

1. Colocou-se 10 gramas dos grãos de sal esférico peneirados num cadinho de alumina para sinterizar.
2. O cadinho foi colocado num forno e aquecido até 755°C , com um patamar de 15 horas. Fez-se um patamar a 500°C durante 1 hora, devido ao facto do sal conter a farinha e haver necessidade de a queimar.

NOTA 1: Repetiu-se o mesmo procedimento para 775°C .

Produção da espuma

1. Preparou-se uma solução de PCL em clorofórmio 5% (p/v).
2. Colocou-se a solução sob agitação até estar homogeneizada.
3. Preparou-se uma suspensão de 1,7 g de *HA* em 2,5 mL de etanol.
4. Colocou-se a suspensão sob agitação mecânica e depois recorreu-se aos ultrassons.
5. Numa placa porosa colocou-se o substrato poroso, *template* de sal, ligou-se o vácuo, entornou-se a suspensão sobre o *template*; o vácuo permitiu a impregnação do sal.
6. Colocou-se o *template* com a suspensão de *HA* impregnada a secar durante 3 horas a 100°C , para o etanol evaporar
7. Após as 3 horas, colocou-se novamente o *template* na placa porosa, ligou-se o vácuo, e verteu-se a solução polimérica sobre a amostra.

8. Para o clorofórmio evaporar, deixou-se a amostra à temperatura ambiente 24 horas.
9. Colocou-se a amostra no vácuo, pelo menos 24 horas.
10. Mergulhou-se o *template* com a suspensão de *HA* e *PCL* em água destilada durante 24 horas, tendo como objectivo remover o substrato poroso, o *template* de sal.

MÉTODO B

Neste método, para produzir as espumas porosas, utilizaram-se os seguintes reagentes

- Pós de *HA*
- *NaCl* ($\rho = 2,165 \text{ g/cm}^3$; sal esférico)
- Poliprolactona, *PCL* (com peso molecular 65 000 e $\rho = 1,145 \text{ g/cm}^3$), Sigma
- Clorofórmio ($\rho = 1,5 \text{ g/cm}^3$)

A figura 2.12 apresenta um esquema geral deste procedimento.

Procedimento experimental

1. Preparou-se uma solução de *PCL* em clorofórmio 13% (p/v).
2. Colocou-se a solução sob agitação até estar homogeneizada.
3. Utilizou-se um volume total de sólidos de 2 mL (sendo o volume dos sólidos a soma do volume do *PCL* com o volume da *HA*).
4. Adicionou-se a *HA* de forma a que se mantivesse uma proporção volúmica de 1:1 (*PCL*: *HA*), executou-se este passo lentamente devido à viscosidade do polímero e da grande quantidade de *HA*.
5. Foi adicionado posteriormente 70% v/v *NaCl* esférico ($v \text{ NaCl} / v (\text{PCL} + \text{HA})$).
6. A solução permaneceu em agitação durante 5 minutos.
7. Verteu-se a suspensão para um molde e deixou-se evaporar o solvente (clorofórmio) à temperatura ambiente.
8. Repetiram-se os passos 6 e 7 para 80% (v/v) de *NaCl* esférico.
9. Repetiram-se os passos 2 a 9 para soluções de *PCL* em clorofórmio 5%, 8%, 10%, 15% e 18% (p/v).

NOTA 1: Foram realizadas 3 réplicas para cada espuma.

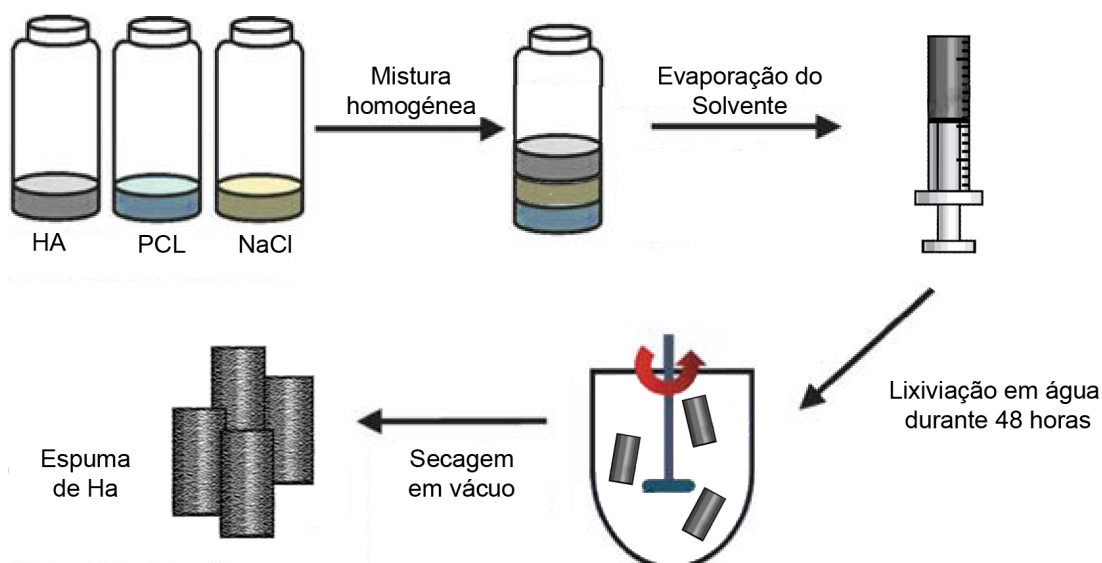


Figura 2.12 – Esquema do Método B.

2.6 Caracterização das espumas

2.6.1 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM – *Scanning Electronic Microscope*) é uma técnica extremamente eficaz que produz imagens de alta resolução, que analisa a morfologia da superfície de uma amostra, permitindo que as imagens tenham uma aparência tridimensional.

No SEM os electrões são emitidos devido ao filamento de tungsténio aquecido (cátodo), acelerado através do ânodo. A aceleração dos electrões provém da aplicação de uma diferença de potencial.

O feixe de electrões é focalizado por duas lentes condensadoras e projectado contra a amostra, desencadeando um aquecimento desta, figura 2.13.

Quando o feixe interage com a amostra há emissão de electrões, nomeadamente de electrões secundários, que são colectados por detectores do microscópio.

O sinal que modula o brilho da imagem provém da resposta ao bombardeamento de electrões, mais frequentemente de electrões secundários, no entanto convém assinalar que o sinal derivado do *backscatter* dos electrões é igualmente importante (Egerton, 2005).

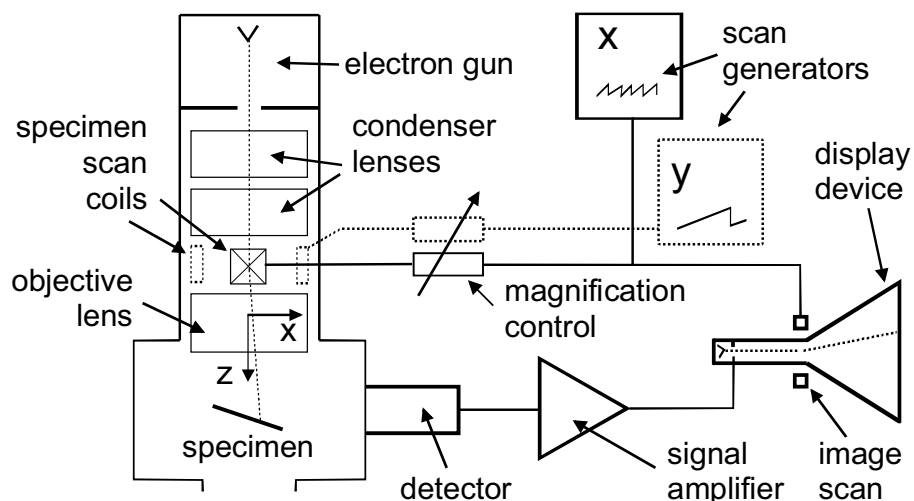


Figura 2.13 – Diagrama esquemático do microscópio electrónico de varrimento (Egerton, 2005).

No âmbito deste trabalho, para análise morfológica foi utilizado o equipamento SEM modelo Zeiss DSM-962 (CENIMAT/I3N).

Procedimento experimental

Houve necessidade de uma preparação cuidadosa para observar as amostras no SEM.

Colocaram-se as amostras num suporte adequado.

As amostras foram revestidas com uma camada de ouro, para tornar as amostras condutoras e assim melhorar o contraste da imagem.

O suporte foi colocado dentro da câmara de observação do microscópio. Antes de observar as amostras procedeu-se ao vácuo. (Morrison, 1996)

2.6.2 Calorimetria diferencial de Varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) é um tipo de análise térmica que permite registar as diferenças dos fluxos de calor, associados a transições de fase nas amostras em função da temperatura.

A diferença no fornecimento de calor entre a amostra em causa e a amostra de referência é medida em função da temperatura (ocorrendo variação da entalpia ou de calor específico), enquanto estas estão submetidas a um programa de aquecimento e arrefecimento controlado (G. W. H. Höhne, 1996).

Para realizar esta análise foi utilizado o aparelho *The Simultaneous Thermal Analyser* STA 449 F3 Jupiter (CENIMAT/I3N), figura 2.14.



Figura 2.14 – Fotografia do aparelho de DSC.

Procedimento experimental

A técnica DSC foi utilizada para analisar o polímero *PCL* e o *NaCl*.

Para o PCL foi realizado um aquecimento até 1300 °C com uma rampa de 5 K/min.

Capítulo 3

Apresentação e Discussão de resultados

3.1 Caracterização dos pós

3.1.1 HA

3.1.1.1 Difracção de Raios X

A técnica de difracção de Raios X foi utilizada com o propósito de identificar com rigor as fases cristalinas nas amostras de hidroxiapatite e para determinar o tamanho da cristalite.

Calculou-se o tamanho da cristalite para cada tempo de envelhecimento, tabela 3.1, tendo-se verificado o aumento do tamanho da cristalite com o aumento de tempo de envelhecimento, como reportado na literatura (Feng, 2005).

Tabela 3.1 – Tamanho da cristalite em função do tempo de envelhecimento, para os pós de HA com uma temperatura de sinterização de 800 °C.

Envelhecimento (h)	Tc (nm)
0	18,50
12	18,68
48	35,34
72	45,60

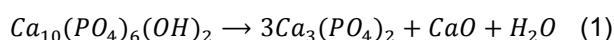
A figura 3.1 mostra o difractograma da HA para uma temperatura de sinterização de 800 °C e diferentes tempos de envelhecimento 0, 12, 48 e 72 horas. Nestes difractogramas existem picos que

não foram identificados, dado que as respectivas intensidades estão muito próximas do limite de detecção do aparelho.

Neste sistema com uma temperatura de sinterização de 800 °C, denota-se claramente que a cristalinidade aumenta consoante aumenta o tempo de envelhecimento.

A partir dos difractogramas é possível concluir que para uma sinterização a 800 °C, em qualquer tempo de envelhecimento observam-se fases cristalinas diferentes da HA, como as fases cristalinas do Óxido de Cálcio – CaO e do β – TCP.

A HA pode ser decomposta em β – TCP e CaO para uma temperatura de sinterização de 800 °C (equação 1) (Feng, 2005).



Como consequência, conclui-se que para obter Hidroxiapatite pura é determinante que a temperatura de sinterização deve ser inferior a 800 °C.

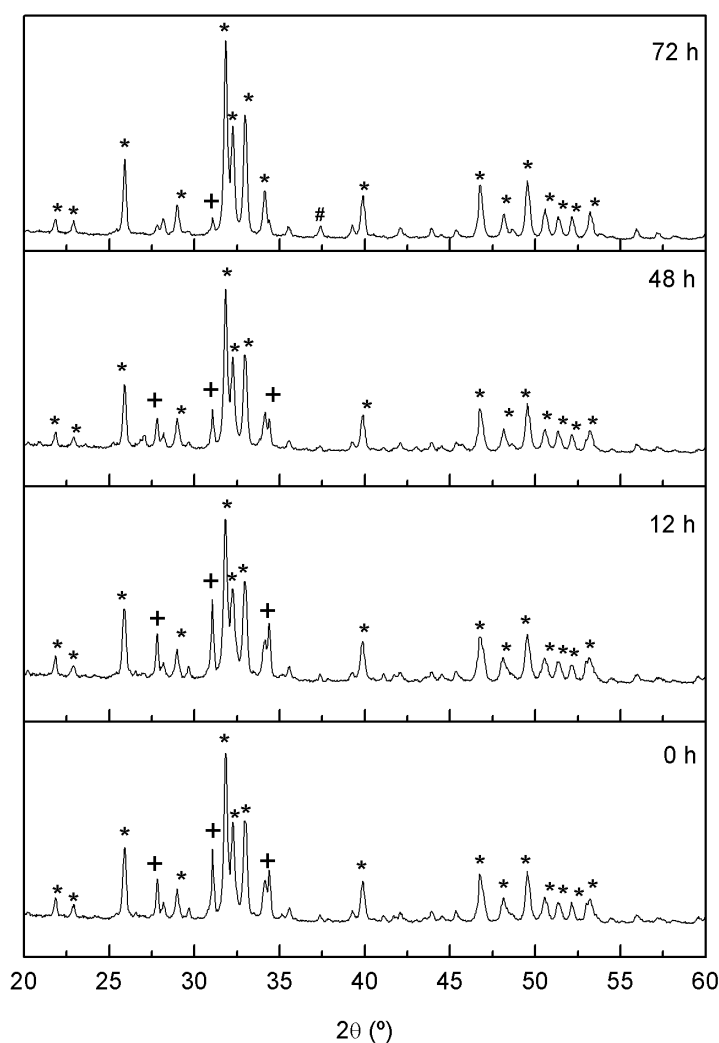


Figura 3.1 – Difractogramas da HA com uma temperatura de sinterização de 800 °C (* - HA; + - β – TCP; # - CaO).

A figura 3.2 apresenta os difractogramas, para uma sinterização a 600 °C durante 30 minutos, com um envelhecimento de 0, 12, 48 e 72 horas. É possível observar que só com um envelhecimento de 72 horas surge uma contaminação de Óxido de Cálcio.

Tabela 3.2 – Tamanho da cristalite em função do tempo de envelhecimento, para os pós de HA com uma temperatura de sinterização de 600 °C.

Envelhecimento (h)	Tc (nm)
0	17,47
12	16,44
48	17,76
72	37,38

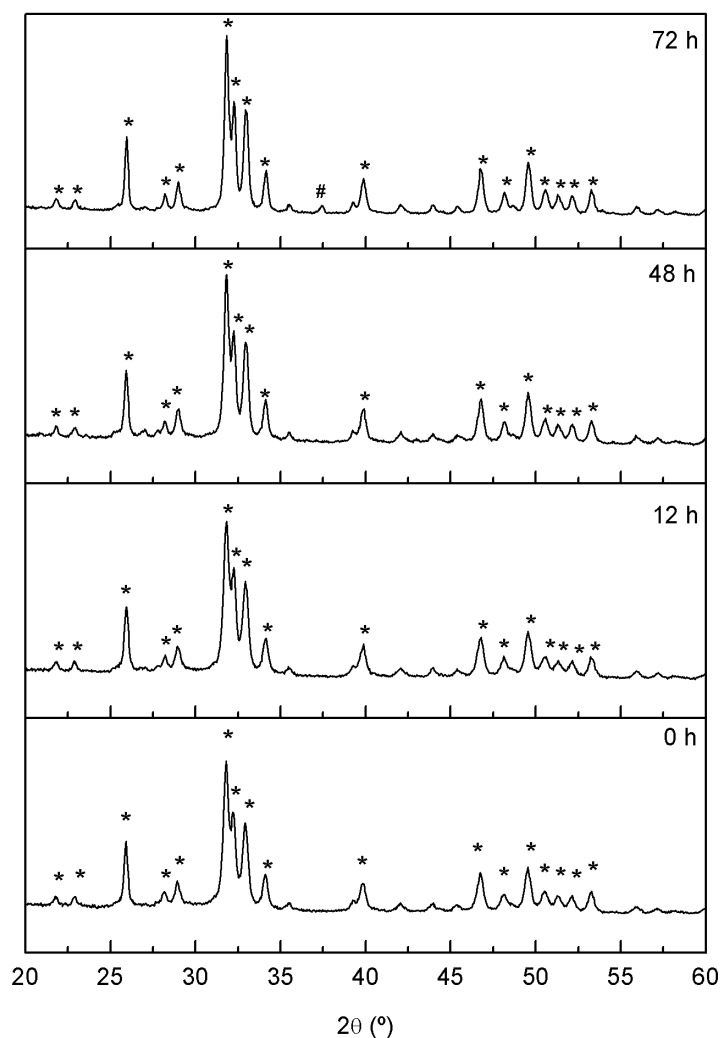


Figura 3.2 – Difractogramas da HA com uma temperatura de sinterização de 600 °C
(* - HA; + - β - TCP; # - CaO).

À medida que o tempo de envelhecimento aumenta, para uma mesma temperatura de sinterização, o tamanho da cristalite deveria aumentar; no entanto como é visível na tabela 3.2 para uma temperatura de sinterização de 600 °C, o aumento não é concordante com a literatura (Feng, 2005); para 0 horas de envelhecimento o tamanho da cristalite é superior ao das 12 horas. Salienta-se que para as 72 horas de envelhecimento esta atinge um aumento significativo, como verificado na literatura (Feng, 2005).

Uma das hipóteses para a evolução do tamanho da cristalite não ser concordante com a esperada para os mesmos valores, pode estar no facto da temperatura de sinterização ser 600 °C, e encontrar-se muito próximo de 500 °C, aos 500 °C a hidroxiapatite ainda é amorfa, assim as fases cristalinas podem não estar bem definidas.

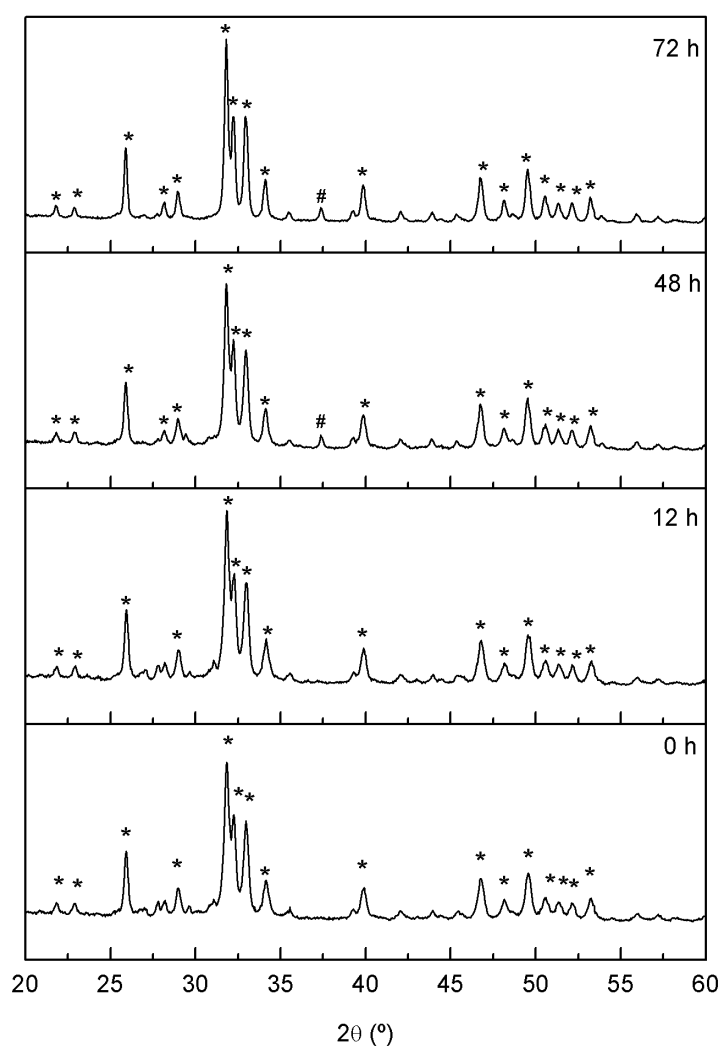


Figura 3.3 – Difractogramas da HA com uma temperatura de sinterização de 700 °C
(* - HA; + - β - TCP; # - CaO).

A figura 3.3 apresenta um sistema onde a temperatura de sinterização de 700 °C, com uma variação de tempo de envelhecimento 0, 12, 48 e 72 horas.

Com base na análise da figura 3.3 é fácil apreender que há uma contaminação de Óxido de Cálcio para um tempo de envelhecimento de 48 e 72 horas.

Tabela 3.3 – Tamanho da cristalite em função do tempo de envelhecimento, para os pós de HA com uma temperatura de sinterização de 700 °C.

Envelhecimento (h)	Tc (nm)
0	18,50
12	31,28
48	35,33
72	46,27

A tabela 3.3 evidencia que para uma mesma temperatura de sinterização de 700 °C, à medida que o tempo de envelhecimento aumenta o tamanho da cristalite também aumenta.

Ao longo do envelhecimento há um aumento do tamanho da cristalite. Contudo entre as 12 horas e as 48 horas de envelhecimento não existe grande diferença, para as 72 horas há aumento significativo. Existem diferenças no tamanho da cristalite, para as 48 horas e 72 horas de envelhecimento, mas para as 72 horas o pico do β – TCP aumenta de intensidade e a hidroxiapatite é menos pura; assim escolheu-se o difractograma das 48 horas para comparar com o difractograma da HA sinterizada a 600 °C com 48 horas de envelhecimento, figura 3.4.

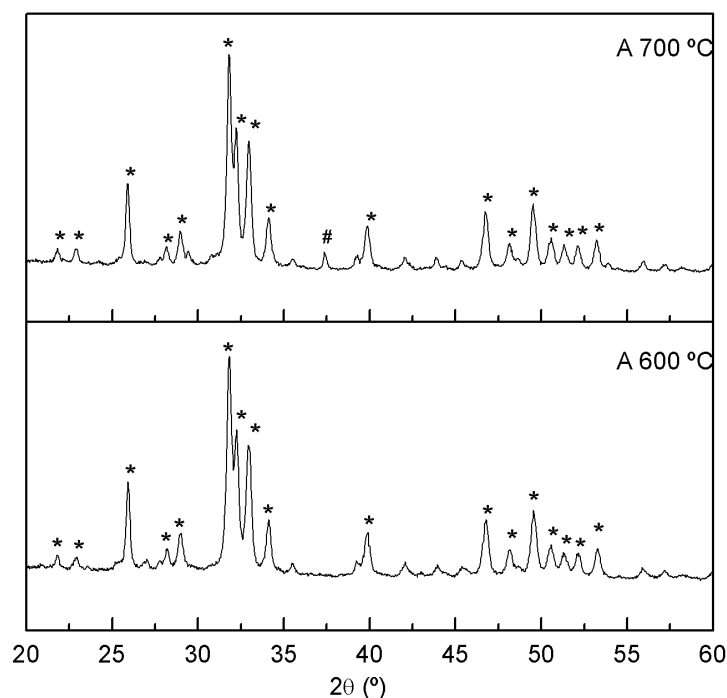


Figura 3.4 – Difractogramas para HA sinterizada a 600 °C e 700 °C com um envelhecimento de 48 horas (* - HA; + - β – TCP; # - CaO).

Tabela 3.4 – Tamanho da cristalite em função da temperatura de sinterização, para os pós de *HA* com um envelhecimento de 48 horas.

Ts (°C)	Tc (nm)
600	17,76
700	35,33

A tabela 3.4, apresenta os valores do tamanho da cristalite em função da temperatura de sinterização. O tamanho da cristalite aumenta com a temperatura de sinterização. Assim a cristalinidade aumenta igualmente com o aumento da temperatura. Contudo a 700 °C surge uma fase de *CaO*, resultante da decomposição da *HA* (Feng, 2005).

Apesar da *HA* sinterizada a 700 °C apresentar uma maior cristalinidade, esta apresenta uma contaminação de *CaO*. Esta contaminação pode ser facilmente contornada; como o produto analisado é um pó, o *CaO* pode ser facilmente retirado com a adição de *HCl*, esta reacção transforma o óxido de cálcio em cloreto de cálcio, dissolvendo-se facilmente em água (Condrate, 1998).

Com o aumento da temperatura, a intensidade dos picos aumenta, a largura a meia altura dos picos mais intensos diminui, resultando em valores de cristalite maiores, como se pode verificar na tabela 3.4.

O tempo de envelhecimento pode ter alguma influência nas fases cristalinas obtidas, mas o factor mais determinante na cristalinidade do pó é a temperatura de sinterização (Feng, 2005).

De uma forma geral pode afirmar-se que se observou em quase todos os difractogramas um aumento da cristalinidade com o aumento da temperatura de sinterização; a largura a meia altura dos picos intensos diminui, resultando num aumento da cristalinidade.

Um dos requisitos mais determinantes para um biomaterial utilizado na substituição óssea é a faculdade de estabelecer uma ligação com o osso vivo. Para tal, é necessário um elevado grau de cristalinidade e estabilidade química, propriedades da *HA* ideal (Rubini, 2004).

O trabalho desenvolvido por Padmanabhana (Padmanabhana, 2009) mostrou que o tamanho de Hidroxiapatite aumenta com a temperatura e mostrou um alongamento anisotrópico do cristal, para nanopós sinterizados a 700 °C.

Segundo Eshtiagh-Hosseini (Eshtiagh-Hosseini, 2007) o aumento do tempo de envelhecimento tem efeitos positivos no desaparecimento de fases impuras, e a sinterizações superiores a 600 °C as impurezas dos fosfatos de cálcio desaparecem.

Como a contaminação de *CaO* é facilmente controlada, a *HA* mais cristalina e pura é *HA* sinterizada a 700 °C com 48 horas de envelhecimento; nas restantes etapas do trabalho laboratorial, quer caracterização dos pós, quer na produção das espumas, foi utilizada *HA* com estas características.

3.1.1.2 FTIR

O espectro de infravermelho da Hidroxiapatite sinterizada a 700°C, com um envelhecimento de 48 horas é apresentado na figura 3.5. Pelo facto da HA apresentar na sua estrutura química, grupos OH e grupos fosfatos, é esperado que o espectro de infravermelho manifeste as mesmas ligações. Pelo espectro é possível observar que o precursor de fósforo é completamente hidrolisado.

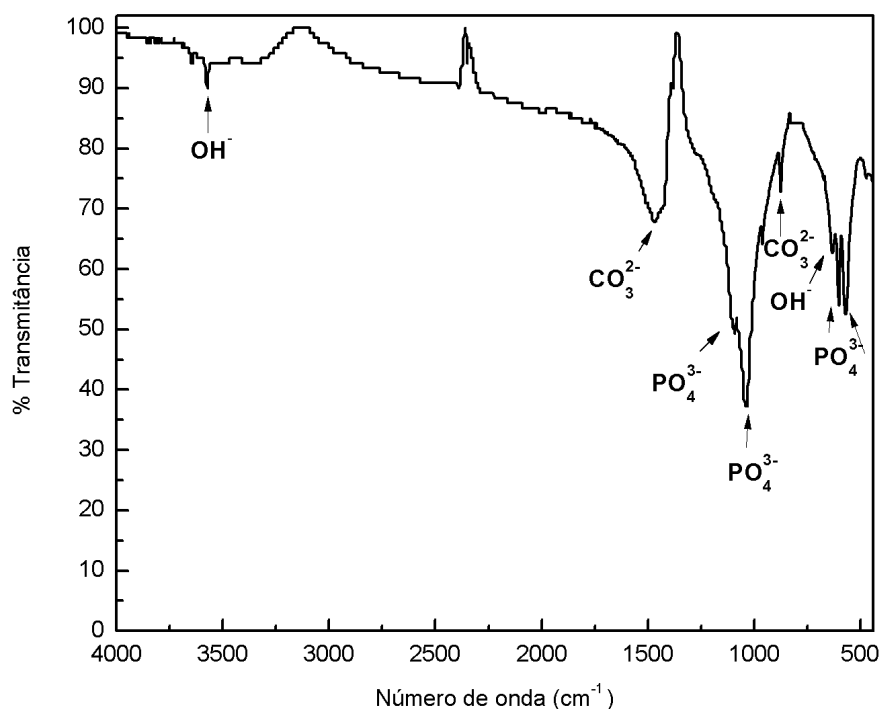


Figura 3.5 – Espectro de FTIR da HA sinterizada a 700 °C, com envelhecimento de 48 horas.

No espectro da Hidroxiapatite, figura 3.5, é possível identificar a banda característica atribuída às vibrações de distensão das ligações OH^- , com número de onda de 3570 cm^{-1} (Padmanabhana, 2009), pico característico da HA, indicando uma boa cristalinidade na amostras (Chen, 2011).

Verifica-se a presença de bandas características de iões de carbonato, nos números de onda de 870 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} . Os modos de vibração do CO_3^{2-} sugerem a presença de hidroxiapatite carbonatada do tipo B (Franco, 2009).

Entre os números de onda 1040 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} observa-se o pico principal do grupo fosfato, sendo este o pico mais intenso nos modos de vibração do grupo fosfato. No caso do comprimento de onda 1040 cm^{-1} há uma deformação simétrica e a 1100 cm^{-1} há uma deformação assimétrica. As bandas características a 570 cm^{-1} e a 600 cm^{-1} correspondem à deformação angular assimétrica dos iões PO_4^{3-} .

3.1.1.3 TEM

Na caracterização morfológica dos pós de Hidroxiapatite, recorreu-se ao *software* de análise de imagem *ImageJ*, para poder determinar o tamanho dos grãos.

A figura 3.6 apresenta duas imagens da Hidroxiapatite, uma dos pós isolados e a outra dos pós aglomerados.

Os pós de *HA* apresentam todas uma escala nano, podendo dar origem a aglomerados sub-micrométricos (figura 3.6 – B).

Um dos contributos relevantes para o facto de existirem aglomerados de *HA* é o tempo de envelhecimento. Para tempos de envelhecimento menores as partículas poderiam encontrar-se mais dispersas, não existindo aglomerados tão grandes (Feng, 2005).

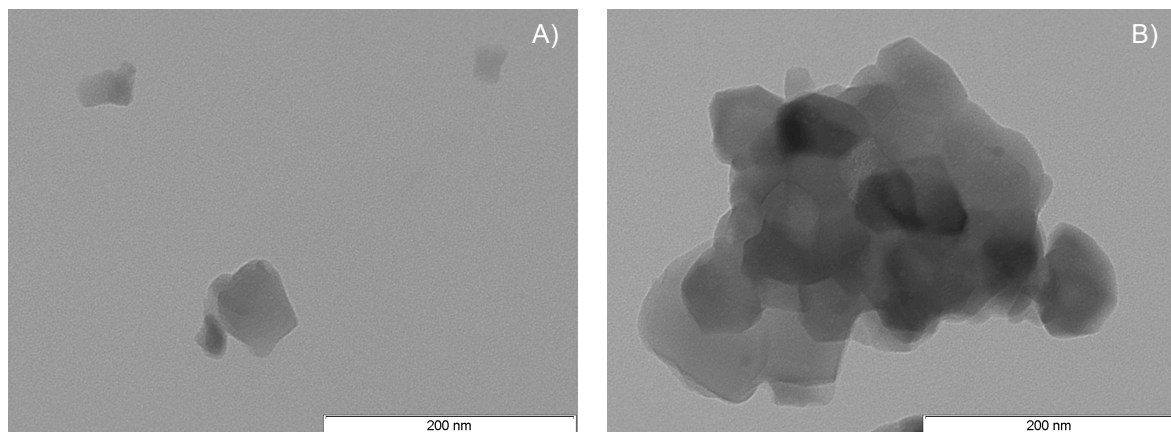


Figura 3.6 – Imagens de TEM dos pós de HA sinterizados a 700°C, com um envelhecimento de 48 horas. A) Pós isolados B) Pós aglomerados.

Relativamente ao tamanho das partículas recorrendo ao programa *ImageJ*, teve-se em conta 4 amostras de menores dimensões e 4 amostras de maiores dimensões.

Os grãos de *HA* da figura 3.6 – A apresentam um diâmetro menor que 70 nm, os aglomerados de grãos de *HA*, figura 3.6 – B, um diâmetro inferior a 330 nm.

3.1.2 β -TCP

3.1.2.1 Difracção de Raios X

Tal como na caracterização da *HA*, a técnica de difracção de Raios X foi utilizada com o intuito de identificar as fases cristalinas nas amostras de β -TCP e determinar o tamanho da Cristalite. Na figura 3.7 encontram-se os difractogramas dos pós de β -TCP sinterizados a diferentes temperaturas. Pela tabela 3.5 constata-se que com o aumento da temperatura, a intensidade dos picos aumenta, a largura a meia altura dos picos mais intensos diminui, resultando em valores de cristalite maiores. Para temperaturas de sinterização de 600 °C e 700 °C é possível observar (figura 3.7) que o pico mais intenso pertence à fase cristalina da *HA*.

Apenas com uma temperatura de sinterização a 800 °C, existem picos da fase cristalina do β -TCP bem definidos. Todos os picos característicos são visíveis. Para as temperaturas de 600, 700 e 800 °C a cristalinidade aumenta mediante o aumento da temperatura de sinterização.

Com base nos difractogramas foram calculados os tamanhos da cristalite do β -TCP, tabela 3.5, verificou-se que com o aumento da temperatura de sinterização, o tamanho da cristalite aumentou; a intensidade dos picos aumenta, a largura a meia altura dos picos mais intensos diminui, a cristalinidade aumenta. Os tamanhos da cristalite para envelhecimento de 600°C e 700°C são menores que 50 nm, de acordo com a literatura (Sanosh, 2010), para tamanhos de cristalite menores que 50 nm há um aumento significativo dos picos de difracção. Contudo é importante referir que a cristalinidade é extremamente importante, e só para uma temperatura de sinterização de 800 °C é que predominam os picos característicos de β -TCP.

Tabela 3.5 - Tamanho da cristalite em função da temperatura de sinterização, para os pós de β -TCP.

Ts (°C)	Tc (nm)
600	10,46
700	15,95
800	85,3

Todos os difractogramas da figura 3.7 apresentam o pico mais intenso da *HA* para $2\theta = 31,013^\circ$ (ficha JCPDS). Era preferível que esse pico não estivesse presente, uma vez que o objectivo da síntese era obter β -TCP o mais puro possível, com fases cristalinas do β -TCP bem definidas. Mas o facto da estrutura química ser muito parecida e apresentarem uma pequena diferença no rácio Ca/P de 1,67 na *HA* e 1,5 no β -TCP, não é um resultado anormal.

Para continuar a caracterização do β -TCP, procedeu-se à análise do β -TCP que tinha uma temperatura de sinterização de 800 °C, dado que era claramente o mais puro e cristalino.

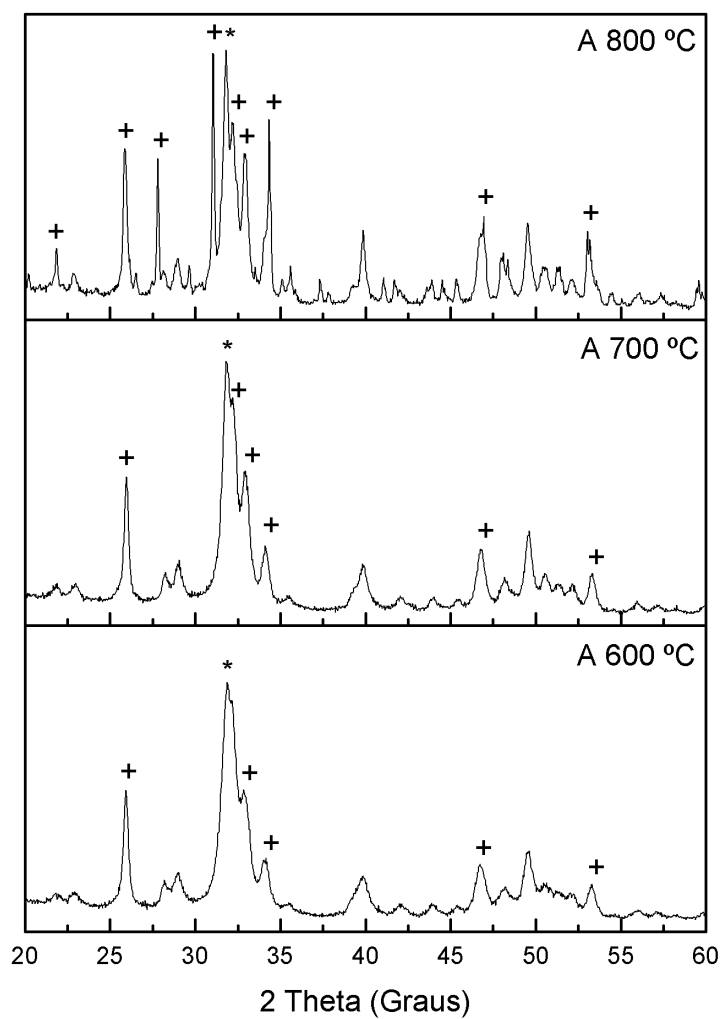


Figura 3.7 – Difractogramas para o β – TCP sinterizado a 600 °C, 700 °C e 800 °
 (* - HA; + - β – TCP; # - CaO)

3.1.2.2 FTIR

Na figura 3.8 é apresentado o espectro de infravermelho do β -TCP sinterizado a 800 °C. Atendendo que na fórmula química do β -TCP existem grupos fosfatos, espera-se que o espectro de infravermelho confirme a presença dessas ligações.

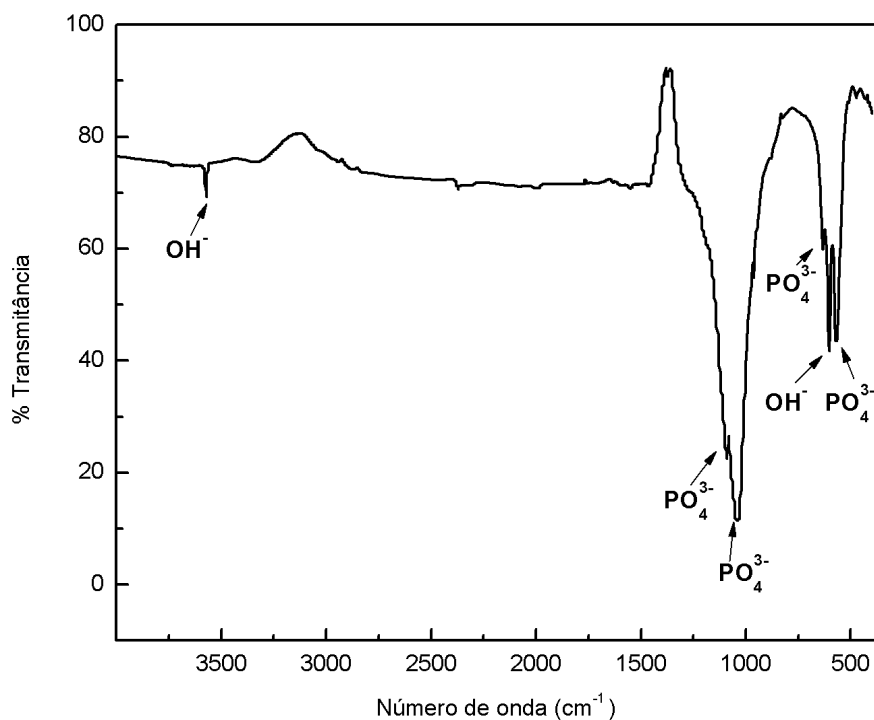


Figura 3.8 – Espectro de FTIR do β -TCP sinterizado a 800 °C.

No espectro da figura 3.8 é possível identificar a banda característica atribuída às vibrações de distensão das ligações OH^- . A banda encontra-se no número de onda de 3570 cm^{-1} , o que indica que estes grupos fazem parte de uma ligação de Hidrogénio.

As bandas características de vibração a 1085 cm^{-1} e a 1050 cm^{-1} correspondem ao modo de *stretching* antissimétrico dos grupos P-O (Sanosh, 2010).

O grupo fosfato surge novamente a 570 cm^{-1} e a 635 cm^{-1} , correspondendo a reflexões que indicam o reordenamento dos poliedros do PO_4^{3-} na estrutura cristalina. Esta tripla degeneração mostra a presença da fase apatítica.

A 611 cm^{-1} há um aumento dos grupos hidroxil, esta banda de vibração deveria posicionar-se a 630 cm^{-1} , encontrando-se num comprimento de onda menor.

3.1.2.3 TEM

Para caracterizar a morfologia dos pós de β -TCP recorreu-se ao software de análise de imagem *ImageJ*, para poder determinar o tamanho dos grãos.

A figura 3.9 apresenta duas imagens de β -TCP, os pós aglomerados, a diferentes ampliações.

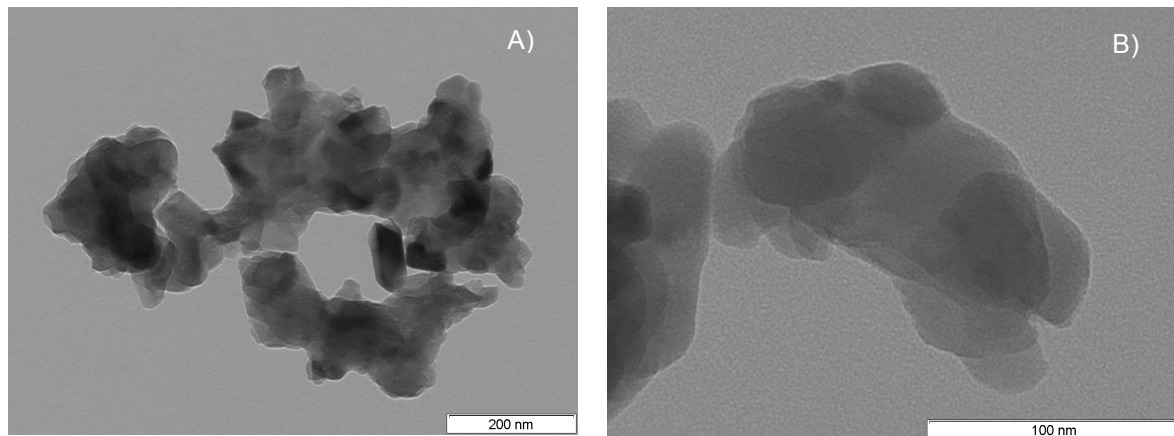


Figura 3.9 – Imagens de TEM dos pós de β -TCP sinterizados a 800 °C.

Existe uma grande aglomeração dos pós de β -TCP, estes deveriam estar mais dispersos, figura 3.9 – A, como aconteceu com os pós de HA; o aglomerado pode ser explicado devido à grande área de superfície dos nanopós e energia associada a estes.

A nucleação e o crescimento das partículas de β -TCP com a temperatura (tabela 3.5) pode ser descrita pelo mecanismo de nucleação-agregação-aglomeração-crescimento, figura 3.10, teoria explicada por Rodríguez-Clemente (Martin, 2006).

De acordo com este mecanismo, as partículas de β -TCP passam pelos seguintes fases:

- nucleação e crescimento para poder formar nanocristalites;
- agregação dos nanocristais por atracção molecular que causa uma energia livre de superfície minimizada;
- um maior crescimento dos cristais, a uma supersaturação residual constante, actuando como agente de cimentação no interior dos agregados, para formar os aglomerados;
- um aumento do tamanho das partículas com a temperatura dá lugar a uma agregação das mesmas, formando partículas secundárias.

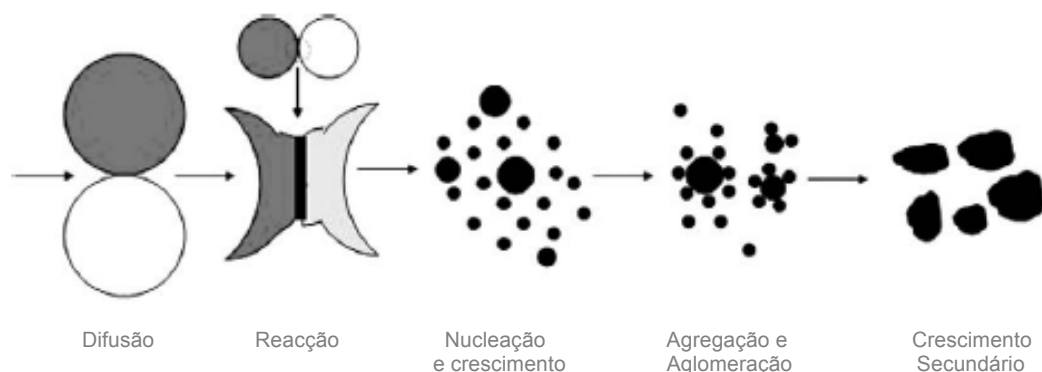


Figura 3.10 Esquema da nucleação e crescimento do β -TCP (adaptado de (Sanosh, 2010)).

Para determinar o tamanho das partículas recorreu-se novamente ao programa *ImageJ*.

Teve-se em conta 4 amostras de menores dimensões e 4 amostras de maiores dimensões.

Os grãos de β -TCP da figura 3.9 – B apresentam um diâmetro menor que 67 nm, os aglomerados de grãos de β -TCP, figura 3.9 – A, um diâmetro inferior a 300 nm.

3.2 Caracterização do sal

Existe um enorme interesse em métodos para alterar a forma dos cristais.

A forma e o tamanho dos cristais do NaCl , tem influência nas propriedades do sal. O sal com morfologia cúbica tem algumas desvantagens comparado com o sal com morfologia esférica; as características de fluxo são inferiores e os cristais possuem uma grande área de contacto.

A forma cúbica de sal comum ocorre por causa do crescimento lento das faces cristalográficas. Existe uma grande quantidade de métodos para alterar a morfologia de cristais a partir de uma solução.

O sal esférico ou quase esférico exhibe menor área de contacto entre os cristais, sendo espectável que exhiba melhores movimentos de fluxo, enquanto ao mesmo tempo ameniza o problema da aglomeração (Mukhopadhyay, 2010).

Um método muito utilizado para mudar a forma do sal de cúbico para esférico é fazer uma suspensão de sal em contacto com a chama a 775 °C (Goodall, 2007).

Para produzir sal esférico, houve alguma necessidade de aperfeiçoar o procedimento da produção de sal esférico. Jinnapat (Jinnapat, 2010) utilizou uma rotação 2000 rpm. Durante a actividade laboratorial, o sal produzido com uma agitação mecânica de 2000 rpm, era consideravelmente pequeno para o objectivo deste trabalho; assim, reduziu-se a agitação para 1000 rpm, obtendo diâmetros médios que foram de encontro ao que se pretendia, de 500 μm . As partículas seleccionadas para a execução das espumas porosas foram peneiradas e apresentam diâmetros superiores a 300 μm .

Para produzir sal esférico, foi preparada uma pasta de farinha, tendo sido misturada ao sal moído, essa pasta serve como um agente de ligação do sal.

A pouca quantidade de água presente na pasta, garante que o sal seja lipofóbico, esta é mecanicamente desagradada, os grãos de sal ficam arredondados na fase da agitação (Jinnapat, 2010).

A concentração da pasta de farinha utilizada no trabalho prático, permite ligações suficientes esta pasta não podia ser extremamente viscosa, para não quebrar no momento da agitação mas desintegrar-se mecanicamente.

Notou-se alguma diferença quando se aumentou o tempo de agitação da pasta e o sal. Inicialmente como é possível ver pela figura 3.11 – A, as partículas não se encontravam suficientemente esféricas. Duas alterações do protocolo foram realizadas; produziram-se dois tipos de amostra, uma com 100 g de sal moído, como referenciado, e tentou-se uma quantidade de sal de 80 gramas; a outra modificação do protocolo foi agitar a pasta mais tempo para que a água envolva melhor o sal.

O processo de aquecimento das partículas de sal na pasta no óleo aumenta a sua rigidez, ocorre uma gelatinização do amido da farinha (processo que decorre no final do aquecimento, com a remoção da água da pasta); a rigidez das partículas evita que os grânulos se aglomerem novamente, e que mantenham a forma esférica.

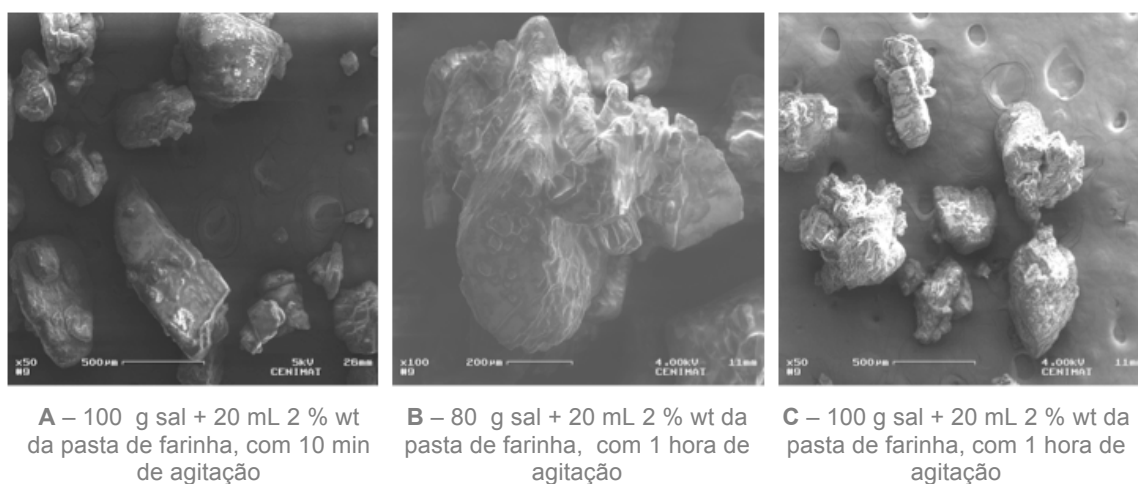


Figura 3.11 – Imagens de SEM do sal arredondado produzido, com diferentes condições.

A figura 3.11 mostra a evolução do protocolo da produção do sal esférico. Inicialmente o processo de homogeneização da pasta era um processo curto, deixava-se a pasta de farinha e o sal moído a agitar cerca de dez minutos, como é possível observar pela figura 3.11 – A, o sal não ficou com a forma esférica como se esperava.

Após a alteração do protocolo para uma hora de agitação, as partículas ficaram claramente mais arredondadas. A figura 3.11 – C tem um grão de sal mais arredondado que a figura 3.11 – B, assim para a produção de sal arredondado optou-se por utilizar uma concentração de 2 wt % da mistura de água e farinha, utilizou-se 20 mL dessa mistura e uma massa de 100 gramas.

Na figura 3.11 – C, mostra grânulos mais arredondado e com superfície rugosa.

3.3 Caracterização das espumas

Um dos objectivos do trabalho era produzir substitutos ósseos à base de β -TCP. Os pós de β -TCP produzidos apresentam uma temperatura de densificação que se encontra fora das especificações dos equipamentos disponíveis, tendo-se abandonado este composto como um dos substitutos ósseos propostos.

MÉTODO A

Para produzir a espuma porosa a metodologia utilizada consistiu na divisão da produção em duas fases.

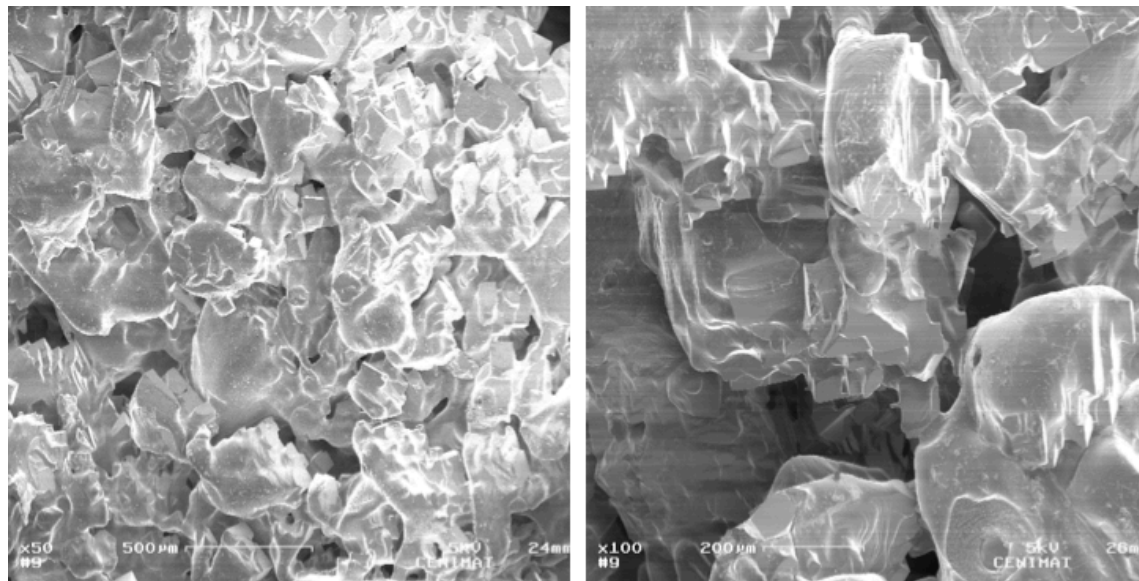
Produção do *template*

Conforme o ANEXO I, a temperatura de fusão do sal usado é 823 °C. Como tal foram utilizadas duas temperaturas para densificar o sal, inferiores à temperatura de fusão: 775 °C (Goodall, 2007) e 755 °C (Jinnapat, 2010).

A figura 3.12 mostra as estruturas densificadas de sal, sinterizadas a 755 °C. As estruturas sólidas que sinterizam a 775 °C apresentam morfologia semelhante. Este estudo foi importante para escolher qual a melhor temperatura de sinterização do sal, numa questão de optimização de trabalho. Uma vez que o objectivo pretendido era obter um *template* de sal, a temperatura sinterização escolhida foi 755 °C.

Pode ser observado, figura 3.12, que após a sinterização a farinha é queimada, dando porosidade ao *template*. As partículas de sal foram sinterizadas durante 15 horas produzindo sal densificado, compacto, que podia ser removido e tratado facilmente sem se fragmentar.

Para observar as imagens da figura 3.12 fragmentou-se o *template*: obteve-se uma superfície fracturada, uma ligação sólida estabelecida pelas partículas circundantes, tal como uma rede de poros esféricos interligados.



A – Sal sinterizado a 755 °C

B – Ampliação do sal sinterizado a 755 °C

Figura 3.12 – Imagens de SEM das estruturas de sal densificadas sinterizadas a 755 °C

Segundo Gross (Gross, 2004) partículas maiores (com diâmetro na ordem dos 300 μm), têm um formato mais irregular, superfícies rugosas e zonas com partículas não fundidas.

Os poros característicos do *template* são diferentes de outro tipo processo de produção de *scaffold*; neste método o tamanho mínimo médio dos poros é dado em função das condições de sinterização. Um maior tempo de sinterização produz tamanhos médios dos poros ainda menores. Tal controle leva a uma *scaffold* com menor resistência ao movimento de fluidos, sendo uma vantagem quando o cerâmico é impregnado no *template*.

Assim, a colocação das células é facilitada, melhorando o transporte de fluidos sobre a *scaffold* quando implementado no corpo, permitindo uma maior penetração dos fluidos nas estruturas.

Os grãos de HA poderiam facilmente preencher os espaços de poros do *template* de sal.

Pela imagem 3.12 – A é possível observar que as partículas mais pequenas de sal são completamente fundidas, enquanto as maiores estão fundidas na superfície, a densificação terá tido início na superfície das partículas mais pequenas, formando-se uma superfície rígida para a restante densificação, acabando por fundir o núcleo dessas partículas. As partículas de sal sofrem uma densificação atribuída ao processo de evaporação/condensação como mecanismo de sinterização dos halogenetos (Moser & Whitmore, 1960)

O mais interessante deste método é o facto de se poder moldar o *template* de sal para a geometria necessária ao implante, o que não acontece noutros métodos, mostrando ter um enorme potencial na engenharia de tecidos.

Produção da espuma porosa

O clorofórmio foi escolhido como solvente, devido à dissolução rápida do *PCL*, que não dissolve os cristais de *HA*, nem o *template* de sal. A dispersão da *HA* no clorofórmio não levou a qualquer dissolução perceptível, permitindo uma boa transferência de partículas de *HA* nos poros do *template* de sal.

Ao verter a solução de *PCL* no *template* de sal com *HA*, a solução penetrou no espaço poroso e na área em torno da *scaffold*. A camada exterior do *template* foi coberta por pós de *HA*, que permaneceu sobre a superfície da *scaffold*, ligados pelo *PCL*.

O momento após a lixiviação foi crucial para compreender que este método não iria funcionar como se esperava: a quantidade de *HA* que impregnou no *template* não tinha sido suficiente, algo que não era espectável. Uma hipótese que pode explicar o que aconteceu está relacionado com a placa porosa utilizada (a mais pequena que se tinha) ter um diâmetro demasiado grande para o tamanho da amostra. Ainda assim procedeu-se à sinterização da *scaffold*, mas este abateu.

MÉTODO B

Para proceder à produção de uma espuma por este método, utilizou-se uma proporção fosfato de cálcio:polímero de 1:1. Na tabela 3.6 são apresentadas as diferentes concentrações dos vários constituintes das espumas.

Fizeram-se espumas com soluções de *PCL* de 5, 8, 10 e 13 % mas não ofereceram suporte à estrutura porosa.

A concentração de polímero para um determinado volume de cerâmico não conferiu consistência suficiente aos green bodies que permitisse o seu manuseamento.

Assim foram utilizadas concentrações de polímero de 15 % e 18%.

Para os cálculos, era necessário saber a densidade da *HA*, assim determinou-se a densidade com o auxílio de um picnómetro de sólidos. A densidade apresentada foi 2,4 g/cm³.

Tabela 3.6 – Concentrações dos vários constituintes das espumas.

PCL (p/p)	15%		18%	
% sal	70%	80%	70%	80%
HA (g)	1,4112	1,332	1,4112	1,332
V _{PCL} (mL)	4,488	4,23	3,74	3,53
NaCl (g)	1,782	1,922	1,782	1,922

Uma análise térmica do polímero foi efectuada com recurso a um DSC (Anexo II) por forma a estabelecer a temperatura de sinterização da fase orgânica, de maneira a eliminar todo o polímero durante esta etapa. A temperatura de fusão foi de 406,8 °C: assim estabeleceu-se o patamar orgânico aos 400 °C.

Na figura 3.13 é apresentado o compósito HA/PCL, para caracterizar morfologicamente o compósito recorreu-se ao ImageJ. É possível observar porosidade, mas não é possível observar interconectividade. Os poros observados na figura 3.13, apresentam diâmetros entre os 500 μm e 190 μm .



Figura 3.13 – Compósito HA/PCL(18%)

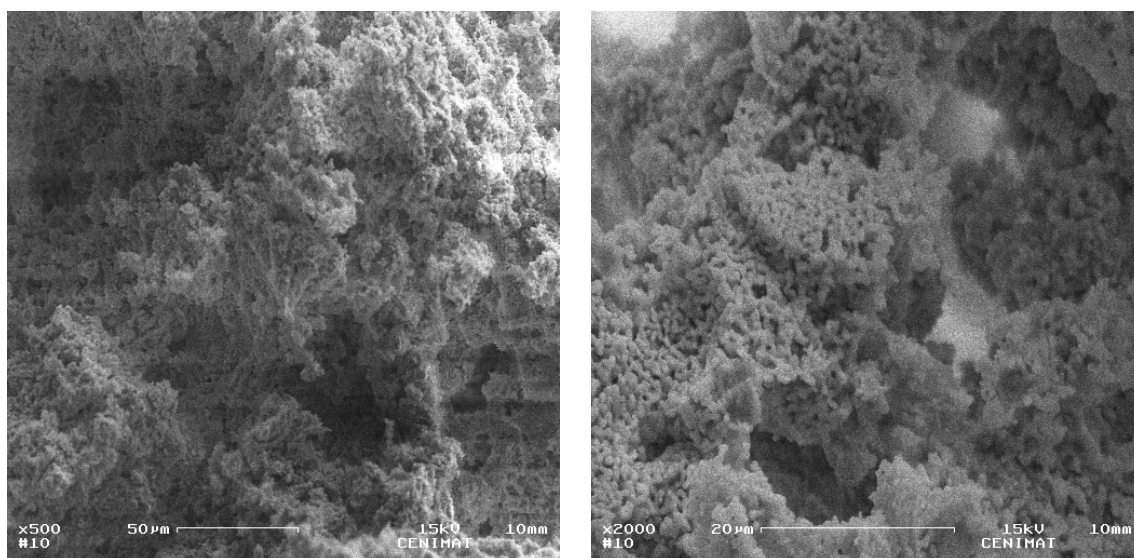
A figura 3.14 é o compósito HA/PCL após a sinterização. Devido à contracção da estrutura houve uma redução volúmica. A espuma apresenta-se densa e rugosa, e com microporos.



Figura 3.14 – Espuma após a sinterização

A imagem de SEM, figura 3.15 – B, permitiu observar que a densificação não é completa. Todas as espumas mostravam pouca densificação, como pouco interligação entre os poros. As espumas apresentam microporos. Os poros provavelmente são tão pequenos porque o polímero não impregnou o *template* de sal suficientemente bem.

Apesar de se ter preparado, quatro tipos de amostras, os resultados foram todos muito concordantes, as imagens no SEM não apresentam diferenças.



A – Espuma com 70% sal, 18% PCL

B – Espuma com 80% sal, 15% PCL

Figura 3.15 – Imagens de SEM de espumas sinterizadas.

Uma vez que através do SEM não foi possível observar qual a espuma que apresentava maior grau de porosidade, deveria ter-se recorrido a técnicas experimentais para determinar a porosidades como a porosimetria por intrusão de mercúrio ou a avaliação aberta de um cerâmico.

Todas as espumas apresentaram pouca porosidade após a sinterização.

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas Futuras

O trabalho realizado ao longo desta dissertação tinha como principal objectivo desenvolver substitutos ósseos porosos, à base de biocerâmicos, os fosfatos de cálcio: hidroxiapatite e β -fosfato tricálcico.

A síntese dos fosfatos de cálcio baseou-se no método Sol-gel. Este método é vantajoso relativamente a outro, uma vez que não necessita de controlo de pH nem de altas temperaturas de sinterização.

A Hidroxiapatite foi produzida, segundo um razão molar de 1,67, utilizando como precursores de cálcio e fósforo o $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ e P_2O_5 , respectivamente.

A difracção de Raios-X permitiu concluir que a hidroxiapatite mais cristalina e pura foi sinterizada a 700 °C e teve um envelhecimento de 48 horas. A cristalinidade e morfologia dos pós dependem da temperatura de sinterização e do tempo de envelhecimento. A partir dos 800 °C a HA pode sofrer decomposições em outras fases, como a fase cristalina β -fosfato tricálcico. A análise morfológica por TEM demonstrou a presença de grãos de Hidroxiapatite com diâmetros menores que 70 nm. Relativamente aos resultados de FTIR, pode-se observar a banda característica das ligações OH^- , pico característico da HA, sinal de uma boa cristalinidade.

O β -fosfato tricálcico, foi sintetizado com uma razão molar Ca/P 1,5. O precursor de cálcio foi $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ e como precursor de fósforo o KH_2PO_4 . Os resultados do DRX mostraram que só para uma temperatura de sinterização de 800 °C se obtêm pós de β -TCP puros. Foi calculado o tamanho da cristalite e verificou-se que para um aumento de temperatura de sinterização o tamanho dos cristais também aumenta. Na análise morfológica dos grãos de β -TCP constatou-se que o tamanho era semelhante aos de HA, mas estes apresentavam aglomerados devido à grande superfície dos nanopós e a energia que lhes pode estar associada.

Para desenvolver substitutos ósseos porosos, produziram-se materiais tridimensionais porosos – as espumas. Utilizaram-se dois processos: replicação por injeção de um polímero num substrato poroso; processo baseado na utilização de partículas porogéneas – a lixiviação.

A partícula porogénea escolhida foi o cloreto de sódio. Produziu-se sal arredondado, uma vez que o sal esférico ou arredondado exibe melhor área de contacto entre os cristais do que o sal cúbico.

Espera-se que aquele melhore os movimentos dos fluidos na espuma. Obteve-se sal arredondado: provavelmente o problema é que o protocolo em que se baseou este procedimento era ajustado para produzir partículas esféricas com uma distribuição de diâmetros maiores do que os pretendidos para produzir as espumas porosas.

Foram utilizados dois métodos para produzir espumas.

O primeiro método teve resultados muito concordantes com a bibliografia. Apesar de ser um processo a melhorar no futuro, uma vez que até à data só se tinha produzido um compósito PCL/HA, sem sinterizar a *scaffold*. Quando se tentou sinterizar a amostra esta abateu porque a quantidade de HA utilizada não era suficiente.

No segundo método, conseguiu-se alguma densificação das espumas, mas a densificação não foi perfeita. As imagens antes da sinterização mostraram uma estrutura bastante porosa, com buracos entre os 500 μm e 100 μm . As amostras após a sinterização mostraram-se mais densas, houve contracção da estrutura e pouco porosidade. Era importante ter avaliado a porosidade por porosimetria por intrusão de mercúrio.

Recomenda-se para trabalhos futuros, aumentar a temperatura de sinterização (a usada não foi suficiente) e aumentar a proporção de *Ha* : *PCL*, para melhorar a resistência mecânica.

Seria interessante, efectuar estudos de citotoxicidade para avaliar a pureza biomédica das espumas de HA produzidas.

Capítulo 5

Bibliografia

- Bao, X. (1999). Synthesis of silicon carbide foams from polymeric precursors and their blends. *Journal of Materials Science* , 34, 2495-2505.
- Barbucci, R. (2002). *Integrated Biomaterials Science*. New York: Kluwer Academic Publishers.
- Becker, H. (1997). *Organikum - Química Orgânica Experimental, Capítulos 2 e 3*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Bigi, A. (1997). Isomorphous Substitutions in [3-Tricalcium Phosphate: The Different Effects of Zinc and Strontium. *Journal of Inorganic Biochemistry* , 66, 259-265.
- Brinker, C. J. (1990). *Sol-Gel Science*. London: Academic Press.
- Bronzino, J. (2008). *Tissue Engineering*. Canada: Elsevier.
- C.L. Martin, G. D. (2006). Discrete element simulations of the compaction of aggregated ceramic powders, . *J. Am. Ceram. Soc.* , 89, 3379–3387.
- Chang, R. (2005). *Química* (8ª Edição ed.). Lisboa.
- Chen, J. (2011). A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders . *Materials Letters* , 65, 1923–1926.
- Condrate. (1998). Sol-gel processing of hydroxyapatite . *Journal of Material Science*, 33 4111-4119
- Costescu, A. (2010). Physico-Chemical properties of nano-sized hexagonal hydroxyapatite powder synthesized by sol-gel. *Digest Journal of Nanomaterials and Biomaterials* , 5, 989-1000.
- Dorozhkin, S. V. (2010). Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31, 1465–1485.
- Dorozhkin, S. V. (2002). Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* , 41, 3130-3146.
- Egerton, R. F. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy*. New York: Springer.
- Eshtiagh-Hosseini, H. (2007). Effects of parameters of sol–gel process on the phase evolution of sol–gel-derived hydroxyapatite. 106, 310–316.
- Feng, W. (2005). A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. 59, 916-919.
- Feng, W. (2005). A simple sol–gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. *Materials Letters* , 59, 916-919.
- Franco, P. (2009). *Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofiação*. Lisboa.
- G. W. H. Höhne, W. H. (1996). *Differential scanning calorimetry: an introduction for practitioners*. Berlin: Springer-Verlag.
- Gibson, I. R. (2000). Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to B-tricalcium phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* , 12, 799-804.

- Goodall, R. (2007). Spherical pore replicated microcellular aluminium: Processing and influence on properties. *Materials Science and Engineering A* , 465, 124–135.
- Gross, K. A. (2004). Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. *Biomaterials* , 25, 4955–4962.
- Habraken, W. (2007). Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 59, 234–248.
- HE, B. B. (2009). *Two-Dimensional X-Ray Diffraction*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Hench, L. L. (1997). Sol-gel materials for bioceramic applications. *Solid State & Materials Science* , 2, 604–610.
- Hoffman, A. e. (1986). *Polymeric Biomaterials*. (N. A. Series, Ed.)
- Hosseini, E.-H. (2007). Effects of parameters of sol–gel process on the phase evolution of sol–gel-derived hydroxyapatite. *Materials Chemistry and Physics* , 106.
- Jinnapat, A. (2010). The manufacture of spherical salt beads and their use as dissolvable templates for the production of cellular solids via a powder metallurgy route. *Journal of Alloys and Compounds* , 499, 43–47.
- Khang, G., & Kim, M. (2007). *Manuals in Biomedical Research: A manual for biomaterials/scaffolds fabrication technology* (Vol. 4). Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Liu, D.-M. (1997). Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* , 8, 227–232.
- Lobo, S. E. (2010). Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. *Materials* , 3, 815–826.
- Luz, A. (2009). *Revestimentos de hidroxiapatite em Titânio obtidos através da técnica de sol-gel : da construção de um Dip Coater ao revestimento de implantes dentários*.
- Martin, C. L. (2006). Discrete Element Simulations of the Compaction of Aggregated Ceramic Powders. *J. Am. Ceram. Soc.* , 89.
- Mondrinos, M. J. (2006). Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone–calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* , 27, 4399–4408.
- Morrison, R. (1996). *Química Orgânica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Moser, J., & Whitmore, D. (1960). Kinetics of sintering of sodium chloride in the presence of an inert gas 1960. *J Appl Phys* , 31, 488–93.
- Mukhopadhyay, I. (2010). Crystallization of Spherical Common Salt in the Submillimeter Size Range without Habit Modifier. *Ind. Eng. Chem. Res.* , 49, 12197–12203.
- Murphy, W. L. (2002). Salt Fusion: An Approach to Improve Pore Interconnectivity within Tissue Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering* , 8, 43–52.
- NCMN. (University of Nebraska-Lincoln) Retrieved 4 10, 2012, from NCMN Electron Microscopy: <http://www.unl.edu/ncmn/cfem/microscopy/TEM.shtml>
- Padmanabhana, S. K. (2009). Sol–gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods . *Particuology* , 7, 466–470.
- Park, J. (2008). *Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications*. New York: Springer.
- Ranito, C. (2009). Fabrico de espumas de Hidroxiapatite para aplicações médicas. Lisboa
- Rath, K. (2005). Novel Materials from Solgel Chemistry . 24–26.

- Reger, D. (1997). *Química: Princípios e Aplicações*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Rodriguez-Clemente, R. (1998). Hydroxyapatite precipitation: a case of nucleationaggregation-agglomeration-growth mechanism,. *J. Eur. Ceram. Soc.* , 18, 1351–1356.
- Rosa, A. L. (2002). Osseointegration and osseoconductivity of hydroxyapatite of different microporosities. *Journal of Material Science: Material in Medicine* , 13, 1071-1075.
- Rubini. (2004). Hydroxyapatite gels and nanocrystals prepared through a sol–gel process
- Salema, R. (1992). *Microscopia Electrónica de Transmissão*. Lisboa: Instituto Nacional de Investigação Científica.
- Sanosh, K. (2010). Sol–gel synthesis of pure nano sized b-tricalcium phosphate crystalline powders. *Current Applied Physics* , 10, 68-71.
- Solomons. (2005). *Química Orgânica* (8ª Edição ed., Vol. Volume 1). (LTC, Ed.)

ANEXOS

ANEXO I

